ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. III No 1

1 9 5 4

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
5 AUG 1954

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie opublikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, Al. Racławickie 20.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie oraz angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski, niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie i rosyjskie lub polskie i angielskie (francuskie, niemieckie). Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora(ów), nazwę i adres zakładu w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania; c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne (nie dłuższe niż 15% tekstu).

Prace należy ujmować treściwie; wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko; tam, gdzie to możliwe, powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze i istotne wyniki. Rysunki i wykresy należy sporządzać w dwukrotnym powiększeniu, tuszem na bristolu bez połysku — każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz nr rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem nru rysunku i wykresu. W objaśnieniach należy podawać powiększenie. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia) oraz dołączyć wykaz tablic i rysunków z podaniem numeracji i miejsca w tekście.

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podawać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Cienkowski (18..) lub (Cienkowski 18..). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwę czasopisma w przyjętych skrótach, tom, ewentualnie zeszyt, stronicę czasopisma; w wypadku zaś cytowania książki: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i firmę wydawcy, ewentualnie stronicę tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml a nie ccm, g — a nie gr, 100^0 — a nie 100^0C, M-molarny, N-normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżniać „%“ — g na 100 g roztworu, „% objętościowy“ — ml na 100 ml roztworu, „stężenie %“ — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich.

W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują *Acta* bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 28.— zł, do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja Acta Microbiol. Polon., Lublin, Al. Racławickie 20).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. III No 1

1954
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek tytularny PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwice, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Lublin, Eugeniusz Pijanowski — członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa.

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Kazimierz Dygdała

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1954

Nakład 871+75 egz.+100 odb.	Oddano do składania 30.XI.53
Ark. wyd. 6,8 druk. 5	Podpisano do druku 6.III.54
Papier druk. bezdrz. 80g, III kl.70x100	Druk ukończono 12.III.54
Cena zł. 10.—	Zamówienie 1427c/53. 5-B-12645

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej Warszawa

J. Janicki, J. Pawełkiewicz, St. Stawicki i *K. Zodrow*

WYTWARZANIE WITAMINY B_{12} PRZEZ PROMIENIOWCE Z RODZAJU *STREPTOMYCES*

Z Zakładu Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Wpłynęło dnia 22.VIII.1953 r.

Od czasu wyodrębnienia witaminy B_{12} przez Rickesa, Brinka, Koniuszego, Wooda i Folkersa (1948) z hodowli *Streptomyces griseus* wzrosło zainteresowanie drobnoustrojami syntetyzującymi tę witaminę, przy czym najwięcej uwagi poświęcano promieniowcom. Robbins, Hervey i Stebbins (1950), posługując się metodą oznaczania przy pomocy *Euglena gracilis,* stwierdzili, że na 88 szczepów promieniowców izolowanych z gleby, 76 wytwarzało witaminę B_{12}. Największa wydajność, jaką ci autorzy otrzymali, wynosiła 0,5 μg witaminy na 1 ml pożywki. Halbrook, Cords, Winter i Sutton (1950) badali wytwarzanie witaminy B_{12} przez drobnoustroje izolowane z nawozu kurzego. Stwierdzili oni przy pomocy *Lactobacillus leichmannii,* że tylko 2,8% wyizolowanych szczepów nie wytwarzało witaminy B_{12}. Burton i Lochhead (1951) poddali badaniom 676 szczepów promieniowców glebowych, posługując się *L. lactis* dla stwierdzenia wytworzonej przez nie witaminy B_{12}. Wykazali oni, że 450 (66,6%) spośród badanych szczepów pobudzało wzrost *L. lactis*. Leviton i Hargrove (1952) podają w przeglądzie zamieszczonym we wstępie swej pracy, że ilość witaminy B_{12} wytwarzana przez promieniowce waha się według różnych autorów od 0,02 do 2,0 μg/ml pożywki. Z polskich autorów Borensztajn i Kuryłowicz (1952) badając różne szczepy promieniowców, także promieniowce izolowane z torfów i mad, otrzymali wydajność czynników wzrostowych dla *L. leichmannii* dochodzącą do 4,8 μg/ml pożywki. Autorzy niniejszej pracy zbadali wytwarzanie witaminy B_{12} przez izolowane z gleby promieniowce z rodzaju *Streptomyces.*

METODYKA BADAŃ

a) *Izolowanie szczepów*

Z próbek gleby odważano 1 g i przygotowywano zawiesinę wodną, rozcieńczając ją wyjałowioną wodą wodociągową w stosunku $1 : 10^6$ lub $1 : 10^7$. Jeden ml zawiesiny wlewano do jałowej płytki Petriego o średnicy 10 cm i mieszano z 15 ml pożywki agarowej o następującym składzie: 200 ml wy-

ciągu glebowego, 800 ml wody wodociągowej, 1 g peptonu, 1 g glukozy ch. cz., 2 g NaCl ch. cz., 0,5 g K_2HPO_4 ch. cz., 15 g agaru (pH pożywki 7,0).

Przygotowanie wyciągu glebowego: 1) kg gleby ogrodowej wytrząsano $^1/_2$ godz. z 2000 ml wody destylowanej, ogrzewano $^1/_2$ godz. w aparacie Kocha, sączono przez bibułę i wyjaławiano przez $^1/_2$ godz. w autoklawie w temp. 120°.

Po upływie 3 — 4 dni hodowli w temp. 25 — 26° izolowano rozwijające się kolonie promieniowców na skośną pożywkę agarową przygotowaną na wyciągu ziemniaczanym.

Przygotowanie pożywki ziemniaczanej: do 1000 ml wyciągu ziemniaczanego dodawano 500 ml wody wodociągowej, 2 g NaCl ch. cz. i 40 g agaru, po czym rozpuszczano w autoklawie. Następnie nastawiano pH pożywki na 7,0 — 7,2 i sączono, dodawano 10 g glukozy ch. cz., rozlewano do probówek o wymiarach 180 × 18 mm i wyjaławiano 15 minut przy 115°. Przygotowanie wyciągu ziemniaczanego: 600 g obranych ziemniaków ucierano na tarce, dodawano 1000 ml wody wodociągowej, wytrząsano $^1/_2$ godz. na trzęsawce, sączono i używano zaraz do przygotowania pożywki.

Czas hodowli na pożywce ziemniaczanej (w temp. 25 — 26°) wynosił 6 — 7 dni. Czystość kultur sprawdzano mikroskopowo i makroskopowo. Przynależność ich do rodzaju *Streptomyces* określano według W a k s m a n a i H e n r i c i e g o (1948) oraz W a k s m a n a (1950). Szczepy przechowywano w temp. —5° w postaci zliofilizowanej. Liofilizacji poddawano zawiesinę zarodników zmieszaną z jałową glebą i piaskiem (50% gleby i 50% piasku). Zawiesinę zarodników otrzymywano przez spłukanie 6 — 7-dniowej hodowli szczepu na pożywce ziemniaczanej za pomocą pereł szklanych i 10 ml wody destylowanej.

b) *Hodowla szczepów na pożywce płynnej*

Do badań nad wytwarzaniem witaminy B_{12} przez wyizolowane z gleby szczepy używano pożywki peptonowo-namokowej o następującym składzie: 15 g zmielonych na śrut ziaren soi, 5 g peptonu, 5 g namoku kukurydzianego, 4 g soli kuchennej jadalnej, 15 g glukozy technicznej (dostarczonej przez Centr. Zarz. Przem. Ziemn.), 10 mg $CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$ p. a., 1000 ml wody wodociągowej (pH pożywki 7,2). Pożywkę rozlewano po 100 ml do kolb Erlenmeyera o pojemności 750 ml. Wyjaławiano ją przez 10 minut w 115°.

Zliofilizowany szczep wysiewano na skośną pożywkę ziemniaczaną i hodowano 6 — 7 dni w temp. 25 — 26°. Po upływie tego czasu spłukiwano w wyżej podany sposób zarodniki i ich zawiesiną w ilości 5 ml zaszczepiano jedną kolbę Erlenmeyera z pożywką peptonowo-namokową. Kolbę umieszczano na 24 — 48 godz. na trzęsawce, która znajdowała się w pomieszczeniu o temp. 25 — 26°. Wykonywała ona 100 pełnych wahań na minutę przy posuwie 8 centymetrów. Uzyskaną w ten sposób hodowlą-matką zaszczepiano 15 kolb Erlenmeyera z pożywką peptonowo-namokową. Każdą kolbę zaszczepiano 5 ml hodowli-matki. Posiane kolby umieszczano w opisanych warunkach na trzęsawce. Po upływie 72, 96 i 120 godzin fermentacji zdejmowano po 5 kolb, zawartość ich zlewano i poddawano badaniu na zawartość witaminy B_{12}.

c) *Oznaczanie witaminy B_{12}*

Oznaczano zawartość witaminy B_{12} w grzybni. W tym celu mierzono

objętość sfermentowanej pożywki, uzyskanej ze zlania zawartości 5 kolb zdjętych z trzęsawki, i wirowano ją dla oddzielenia grzybni. Płyn fermentacyjny wylewano, a odwirowaną grzybnię przenoszono do kolby, zalewano wodą destylowaną w ilości równej połowie objętości sfermentowanej pożywki i silnie wstrząsano celem rozbicia skupień grzybni. Do tak uzyskanej zawiesiny grzybni dodawano 10%-owego roztworu KCN (około 1 ml roztworu na 100 ml zawiesiny), doprowadzano pH do wartości 6 — 6,5 i pozostawiano na 1 godzinę. Następnie zawiesinę autoklawowano przez 10 min. przy 115°.

Do oznaczeń pobierano 10 ml autoklawowanej zawiesiny grzybni i rozcieńczano ją jałową wodą destylowaną w granicach od 1:10 000 do 1:100 000. Z wykonanych rozcieńczeń pobierano po 5 prób (każda objętości 2 ml) i poddawano oznaczeniu zawartości witaminy B_{12} metodą mikrobiologiczną przy pomocy *Euglena gracilis*, opisaną przez Janickiego, Pawełkiewicza, Stawickiego i Zodrowa (1953a). Z uzyskanych 5 wyników oznaczenia obliczano średnią. Zawartość witaminy B_{12} w grzybni podawano w przeliczeniu na 1 ml sfermentowanej pożywki.

Równolegle z badaniem autoklawowanej zawiesiny grzybni wykonywano badanie kontrolne pożywki peptonowo-namokowej nie poddanej fermentacji. Pożywka ta nie wykazywała obecności witaminy B_{12}. W szeregu przypadków sprawdzono ilość wytworzonej przez badane szczepy witaminy metodą spektrofotometryczną, podaną przez Janickiego, Pawełkiewicza, Stawickiego i Zodrowa (1953b).

WYNIKI BADAŃ

Zbadano 50 szczepów promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. Połowa z nich była wyizolowana z piaszczysto-gliniastej gleby ornej z okolic Poznania, połowa z gleby ogrodowej. Pobranie prób gleby jak i izolację szczepów wykonano w czerwcu 1952 r., używając świeżych prób.

Jak już wspomniano, zawartość witaminy B_{12} w grzybni oznaczano po 72, 96 i 120 godzinach trwania procesu fermentacji. Codziennie badano mikroskopowo rozwój grzybni w preparatach mazanych barwionych błękitem metylenowym. Badania mikroskopowe wykazywały, że okres poprzedzający zarodnikowanie lub początek zarodnikowania zbiega się z najwyższym poziomem witaminy B_{12} w grzybni. Podobne zjawisko, dotyczące poziomu streptomycyny w płynie fermentacyjnym, podają Principe i Thornberry (1952). Spadek zawartości witaminy B_{12} w grzybni następował w miarę jej rozpadu i powstawania coraz to większej ilości zarodników.

Nie stwierdzono zarodnikowania przed upływem 48 godzin procesu fermentacji, a u niektórych szczepów nie obserwowano go nawet w czasie 120 godz. hodowli na trzęsawce. Hodowle te rosły zwykle w postaci kulistych skupień grzybni i po 120-godzinnym procesie fermentacji nie wytworzyły w żadnym przypadku ponad 0,3 μg witaminy B_{12} na 1 ml pożywki. Fermentacji z takimi szczepami nie prowadzono dłużej, lecz przerywano ją, podobnie jak we wszystkich innych przypadkach, najdalej po 120 godzinach. Jeśli szczep wykazywał początek zarodnikowania i rozpadu grzybni np. po 72 godz. fermentacji, a po upływie 96 godz. wyraźny rozpad grzybni, hodowli dłużej nie prowadzono, lecz przerywano ją po 96 godzinach.

Zarodnikowanie w większości przypadków zaczynało się po 72 — 96 godzinach fermentacji. Przykładem takich szczepów jest szczep oznaczony w naszych badaniach jako nr 19. Wytwarzał on witaminę oraz zarodnikował, jak wykazuje tabela I.

Tabela I

Wytwarzanie witaminy B_{12} oraz zarodnikowanie szczepu nr 19
Продуцирование витамина B_{12} и образование спор у штамма №19
The sporulation and the vitamin B_{12} production in *Streptomyces* strain No 19

Czas trwania ferm. w godz.	Zawartość wit.B_{12} w μg/ml pożywki	Obecność zarodników	pH
48	0,30	—	7,30
72	0,45	±	7,80
96	0,31	+	8,05
120	0,15	++	8,40

Wyniki badań nad wytwarzaniem witaminy B_{12} przez wyizolowane szczepy zestawiono w tabeli II, uwzględniając tylko najwyższą wartość otrzymaną przy oznaczaniu prób pobranych po 72, 96 bądź 120 godzinach fermentacji.

Tabela II

Wytwarzanie witaminy B_{12} przez badane szczepy z rodz. *Streptomyces*
Образование витамина B_{12} исследуемыми штаммами из рода *Streptomyces*
Vitamin B_{12} production by examined strains of *Streptomyces*

Ilość wit. B_{12} w μg/ml pożywki	Ogólna ilość szczepów	Ilość szczepów z gleby ornej	Ilość szczepów z gleby ogrodowej
0	7	3	4
ślady — 0,05	5	1	4
0,05 — 0,1	9	3	6
0,1 — 0,3	19	10	9
0,3 — 0,5	6	4	2
0,5 — 0,8	2	2	0
0,8 — 1,0	2	2	0

Wyniki zawarte w tabeli II wykazują, że większość zbadanych (86%) szczepów ma zdolność wytwarzania witaminy B_{12}. Największa ilość szczepów wytwarzała 0,1 — 0,3 μg witaminy na 1 ml pożywki. Szczepy produkujące 0,3 — 0,5 μg witaminy na 1 ml pożywki stanowią grupę mniej liczną, a jeszcze rzadsze są szczepy wytwarzające powyżej 0,5 μg na ml pożywki. Największą wydajność wykazały 2 szczepy (tab. II — ostatnia grupa szczepów), które wytwarzały 0,85 i 0,91 μg witaminy B_{12} na 1 ml pożywki (0,86 i 0,82 μg/ml wg oznaczenia metodą chemiczną). Nie stwierdzono większych różnic w wytwarzaniu witaminy B_{12} między szczepami pochodzącymi z gleby ornej i ogrodowej. Nie spotkano jednak wśród szczepów pochodzących

z gleby ogrodowej żadnego, który by produkował więcej niż 0,5 μg witaminy na ml pożywki. Być może, zbadanie większej ilości szczepów dałoby odmienny układ ich wydajności.

Wymienione dwa najbardziej wydajne szczepy użyto do badań nad opracowaniem metody otrzymywania krystalicznej witaminy B_{12}. W tym celu ze szczepu zliofilizowanego wyhodowano w wyżej podany sposób kulturę-matkę. Następnie przeszczepiano ją (po 5 ml) do 20 — 60 kolb Erlenmeyera z pożywką peptonowo-namokową i umieszczano na trzęsawce, uzyskując po 24 godz. kulturę-matkę właściwą. Tą ostatnią zaszczepiano (także po 5 ml) 400 — 1000 kolb Erlenmeyera z pożywką peptonowo-namokową i hodowano na trzęsawce. W ten sposób uzyskiwano grzybnię z 40 — 100 litrów sfermentowanej pożywki. Fermentację przerywano na podstawie obrazu mikroskopowego, w momencie pojawiania się zarodników. Krystaliczną witaminę B_{12} wydobywano z grzybni (Janicki, Pawełkiewicz, Stawicki, Szebiotko i Zodrow, 1953c).

Przy poszukiwaniu szczepów drobnoustrojów wytwarzających witaminę B_{12} ważne jest posiadanie szybkich metod jej wykrywania. Metody mikrobiologiczne, z których najlepsze wyniki daje metoda z *Euglena gracilis* (Heinrich, 1952), są z reguły skomplikowane w wykonaniu i wymagają dłuższego czasu. Opracowaliśmy szybką metodę wykrywania witaminy B_{12}, pozwalającą także na szacunkowe określenie jej ilości. Dała ona dobre wyniki przy badaniu zawartości witaminy B_{12} w grzybniach promieniowców. Metoda ta, którą podajemy poniżej, została opracowana w oparciu o spektrofotometryczną metodę ilościowego oznaczania witaminy B_{12} (Janicki, Pawełkiewicz, Stawicki, Zodrow, 1953b). Ma ona przebieg następujący:

Do oznaczenia pobiera się około 150 ml sfermentowanej pożywki i odwirowuje się grzybnię. Następnie zadaje się grzybnię wodą destylowaną w ilości równej połowie objętości sfermentowanej pożywki, zakwasza 20%-owym roztworem kwasu trójchlorooctowego do pH 3,0 i ogrzewa 15 minut w temp. 60°. Po ostudzeniu wiruje się, pobiera 50 ml klarownego płynu, alkalizuje się go 10-procentowym roztworem NaCN do pH 8,0 i pozostawia na jedną godzinę. Następnie dodaje się 8,0 g bezwodnego Na_2SO_4, alkalizuje 20%-wym roztworem NaOH do pH 11,0, a następnie ekstrahuje się przez wytrząsanie z 5 ml alkoholu benzylowego. Oddzieloną warstwę alkoholu benzylowego wiruje się w małej probówce. Z odwirowanego alkoholu benzylowego pobiera się 4 ml, przenosi do probówki o pojemności około 15 ml, zadaje 4 ml chloroformu i 1 ml wody destylowanej. Całość wstrząsa się silnie i wiruje. Różowe zabarwienie warstwy wodnej wskazuje na obecność witaminy B_{12}. Intensywność zabarwienia nasila się ze wzrostem zawartości witaminy. Porównując intensywność uzyskanego zabarwienia ze skalą wykonaną na znanych roztworach czystej witaminy B_{12}, można było szacunkowo określić wydajność badanych promieniowców.

W naszych doświadczeniach, wyraźne zabarwienie warstwy wodnej dawały szczepy wytwarzające powyżej 0,3 μg witaminy B_{12} na 1 ml pożywki. Metoda ta pozwalała na wykonanie wielu oznaczeń w ciągu dnia i na szybkie eliminowanie szczepów promieniowców nie wytwarzających lub wytwarzających mało witaminy B_{12}.

Liofilizację szczepów zawdzięczamy uprzejmości dra R. Kotelby, adiunkta Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej A. M. w Poznaniu. Namok kukurydziany otrzymaliśmy z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie, za co wyrażamy podziękowanie dyr. Gumułce i dyr. Synowiedzkiemu.

Я. Яницки, Ю. Павелкевич, Ст. Ставицки и *К. Зодров*

ОБРАЗОВАНИЕ ВИТАМИНА B_{12} АКТИНОМИЦЕТАМИ ИЗ РОДА *STREPTOMYCES*

Резюме

Авторами исследовано образование витамина B_{12} 50 штаммами актиномицетов из рода *Streptomyces*, обособленных из почвы. Они культивировались на пептонной среде с кукурузным экстрактом, на установке для взбалтывания. Определялось количество витамина B_{12}, содержащегося в мицелии. Витамин B_{12} был обнаруживаем при помощи *Euglena gracilis*. Способность к образованию витамина B_{12} обнаружено у 86% исследуемых штаммов. Максимальная продуктивность составляла 0,91 μг витамина B_{12} на 1 мл среды. Выработан скорый метод обнаруживания и определяния приблизительного количества витамина B_{12} в мицелиях актиномицетов.

J. Janicki, J. Pawełkiewicz, St. Stawicki and *K. Zodrow*

VITAMIN B_{12} PRODUCTION BY *STREPTOMYCES*

Summary

The ability of vitamin B_{12} production by 50 strains of *Streptomyces* isolated from various soils was examined. The microorganisms were grown in the corn-steep liquor pepton fluid medium in shake flasks. The contents of vitamin in mycelium was determined by *Euglena gracilis* method.

86% of examined strains of *Streptomyces* produced vitamin B_{12} with maximal yield 0,91 μg/ml. The description of a new physical-chemical method for assaying the vitamin B_{12} content in mycelium is given.

LITERATURA

1. Borensztajn D. i Kuryłowicz W., 1952: Otrzymywanie koncentratów witaminy B_{12} z płynów fermentacyjnych szczepów rodzaju *Streptomyces*, *Medyc. Doświadcz. i Mikrobiol.*, **4**:483.
2. Burton M. i Lochhead G., 1951: Studies on the production of vitamin B_{12}-active substances by microorganisms, *Canad J. Bot.*, **29**:352.
3. Halbrook E. R., Cords F., Winter A. R., a. Sutton T. S., 1950. Vitamin B_{12} production by microorganisms, *J. Nutrition*, **41**:555.

4 Heinrich H. C., 1952: Eine einfache Methode zur colorimetrischen Bestimmung der B_{12}-Vitamine, *Z. Anal. Chem.*, 135:251.
5. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St. i Zodrow K., 1953 a: Oznaczanie witaminy B_{12} przy pomocy *Euglena gracilis*, *Przem. Chem.* 9:614.
6. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St. i Zodrow K., 1953 b: Spektrofotometryczna metoda oznaczania witaminy B_{12} w hodowlach drobnoustrojów, *Przem. Chem.* 9:385.
7. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Szebiotko K. i Zodrow K., 1953 c: Otrzymywanie krystalicznej witaminy B_{12} z hodowli promieniowców z rodzaju *Streptomyces*, *Przem. Chem.*, w druku.
8. Leviton A. a. Hargrove R., 1952: Microbiological Synthesis of Vitamin B_{12} by Propionic Acid Bacteria, *Ind. Eng. Chem.*, **44**:2651.
9. Principe P. A. a. Thornberry H. H., 1952: Effect of cobalt on production of streptomycin and B_{12} by *Str. griseus*, *Phytopatology*, **42**:123.
10. Rickes E. L. Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R. a. Folkers K., 1948: Comparative data on vitamin B_{12} from liver and from a new source, *Streptomyces griseus*, *Science*, **108**:634.
11. Robbins W. J., Hervey A. a. Stebbins M. E., 1950: Studies on *Euglena* and Vitamin B_{12}, *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 77:423.
12. Waksman S. A. a. Henrici A. T., 1948: wg Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
13. Waksman S. A., 1950: The Actinomycetes, Annales Cryptogamici et Phytopathologici, Vol. 9.

Komunikat Nr 2

W związku z mającym się odbyć w dniach od 26 do 29 września 1954 r. w Poznaniu Zjazdem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów Komitet Organizacyjny podaje do wiadomości następujący komunikat:

ORGANIZACJA ZJAZDU

Komitet Mikrobiologiczny PAN i Zarząd Główny PTM zaproponował 2 główne referaty: a) Mikrobiologia wody (ref. prof. dr Just), b) Zmienność drobnoustrojów (ref. prof. dr Kunicki-Goldfinger).

Obrady Zjazdu mają się odbywać w następujących sekcjach: a) chemia i fizjologia drobnoustrojów, b) inhibitory drobnoustrojów, c) technika mikrobiologiczna i diagnostyka, d) immunologia, e) zmienność drobnoustrojów, f) rickettsje i wirusy, g) bakteriologia szczegółowa: drobnoustroje jelitowe, h) bakteriologia szczegółowa: gruźlica, i) bakteriologia szczegółowa: inne bakterie, j) surowice i szczepionki, k) mikrobiologia gleby, l) mikrobiologia wody i ścieków, m) mikrobiologia żywności, n) mikrobiologia mleczarska, o) mikrobiologia przemysłów fermentacyjnych.

W każdej sekcji ma być wygłoszony $^1/_2$-godzinny referat kierunkowy.

Doniesienia mogą trwać tylko 10 minut.

WARUNKI ZGŁASZANIA PRAC NA ZJAZD

1. Komunikaty powinny być zgłaszane przez kierowników zakładów (profesorów i dyrektorów instytucji, kierowników komórek laboratoryjnych w stacjach san. epid., kierowników placówek naukowo-badawczych w przemyśle i w wojsku).

Kierownicy ponoszą odpowiedzialność za treść i poziom naukowy prac.

2. Można zgłaszać tylko takie prace, które nie były ogłaszane.

3. Komitet Zarządu Głównego PTM zastrzega sobie prawo doboru nadsyłanych prac.

4. **Termin zgłaszania tematów prac** z równoczesnym załączeniem streszczeń został ustalony na dzień **1 maja 1954 r.** Zgłoszone tematy prac bez załączenia streszczeń nie będą uwzględnione w programie.

5. Streszczenia prac nie powinny zawierać więcej niż 20 — 25 wierszy, natomiast prac kierunkowych 1,5 strony maszynopisu.

6. Wyznaczony termin zgłaszania prac nie może być przekroczony, ponieważ streszczenia mają być wydrukowane przed Zjazdem.

7. Ze względu na dużą liczbę sekcji na zjeździe, Komitet Organizacyjny nie będzie mógł dysponować dostateczną ilością zaciemnionych sal i dlatego uprasza o przygotowanie tablic, nie licząc na epidiaskop. Bezwzględną potrzebę epidiaskopu należy zgłaszać z równoczesnym podaniem tematu.

Adres Komitetu Organizacyjnego: *Poznań, Al. Stalingradzka 3, Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM*

Sekretarz
(—) Doc. dr *J. Wiza*

Przewodniczący
(—) Prof. dr *J. Adamski*

D. Shugar and *J. Baranowska*

STUDIES ON THE GRAM STAIN — THE IMPORTANCE OF PROTEINS IN THE GRAM REACTION.

Department of Biochemistry, P. Z. H., Warszawa
Received: October 31.X.1953.

INTRODUCTION

The view that the gram-staining characteristics of micro-organisms are determined exclusively by certain ribonucleoproteins located at the cell surface has become so widespread, that even the reservations regarding its validity subsequently expressed by some of its previous supporters have received very little attention.

Hottinger (1915) appears to have been the first to suggest some relationship between the Gram reaction and the cellular nucleoproteins, although he did not believe that nucleic acids were the only substances involved. Deussen (1918, 1920, 1921) then showed that gram-positive cells such as *Saccharomyces, S. aureus, B. mycoides* could be made gram-negative by acid or alkaline hydrolysis or through partial autolysis, following which they could again be made gram-positive by treatment with the sodium salt of RNA. Deussen's conclusion that the Gram reaction was due entirely to nucleic acids was objected to by a number of observers including Guttstein (1925), Schumacher (1928), Deletang (1933) and others, all of whom showed that much of the nucleic acids could be extracted from the cells without rendering them gram-negative and only subsequent extraction with lipid solvents in the presence of mineral acids converted them to the gram-negative state. Mitchell a. Moyle (1950), for example, extracted more than 90% of the nucleic acids of gram-positive organisms with no loss in gram-positivity. Schumacher (1928) succeeded in converting yeast cells to the gram-negative state by extraction of a lipo-protein, the lipid component of which was itself gram-positive *in vitro*, and the addition of which to the extracted yeast cells resulted in a restoration of the gram-positive character of these latter, although with reduced intensity of staining.

Following the observations of Dubos (1937) and his collaborators (Dubos, 1947) on the controlled autolysis of pneumococci and staphylococci, in which the initial stage appeared to be a conversion to the gram-

negative state with the concommitant release into solution of RNA and ribonucleoproteins, the question was taken up anew by Henry a. Stacey (1943, 1946) who showed that a variety of gram-positive organisms could be rendered gram-negative by extraction with bile-salts with the release of RNA and smaller quantities of DNA, protein and polysaccharide, as well as magnesium. By maintaining the extracted cells in a reduced state by the addition of formaldehyde, they could be converted to the gram-positive form by exposure to the magnesium salt of RNA, somewhat less effectively with the sodium salt of RNA and not at all with DNA, nucleotides or nucleosides. Confirmations of these observations was soon forthcoming from a number of sources, including Bartholomew a. Umbreit (1944) who also used ribonuclease in place of bile-salts, Tarasewicz (1947), etc. The theory was advanced by Henry a. Stacey (1946) that the Gram complex consists of a magnesium ribonucleoprotein, the protein component of which is rich in arginine and — SH groups, and located at the cell surface.

In view of the fact that the mucopolysaccharide substrate of lysozyme is known to be located at the cell surface of lysozyme-susceptible organisms, it appeared to us of interest to examine the reaction of lysozyme on cells which had been extracted with bile-salts by the method of Henry a. Stacey (1946) or with ribonuclease (Bartholomew a. Umbreit, 1944). It was then noted that cells of *Micrococcus lysodeicticus*, rendered gram-negative in this way, and maintained in the presence of formaldehyde, were gradually transformed to the gram-positive state following the addition of lysozyme. The obvious importance of this observation in relation to the mechanism of the Gram reaction led us to investigate the phenomenon in greater detail. The extension of these studies to natural gram-negative organisms has been reported elsewhere (Shugar a. Baranowska, 1953).

MATERIALS AND METHODS

The following strains of bacteria were used in these studies: *Saccharomyces cerevisiae, Bac. subtilis, Staph. aureus, Cl. welchii, M. lysodeicticus, Bac. stearothermophilus* (Georgi et al., 1951).

M. lysodeicticus and *B. subtilis* were cultivated on agar slant media consisting of 900 ml. beef extract, 200 ml. H_2O, 13 gms. peptone-tryptone, 6,5 gms. NaCl, 5 gms. glucose, 1 gm. yeast extract, 19.5 gms. agar. The medium used for *S. aureus* consisted, of 250 ml. H_2O, 2 gms. nutrient broth, 0,25 gms. glucose, 1,5% agar; that for *Cl. welchii* of 1 liter liver extract, 5 gms. NaCl, 5 gms. glucose. A malt medium containing 2% agar was used for the yeast cells while *B. stearothermophilus* was grown in a fluid medium in test tubes and made up with 250 ml. H_2O, 2 gms. nutrient broth, 0.5 gms. NaOH, 1.7 gms. KH_2PO_4, 0.25 gms. glucose. The pH of all media was within the range 7.0 — 7.4.

M. lysodeicticus, B. subtilis and *S. aureus* were grown for 18 hours at 37°; *Cl. welchii* for 3 — 4 hours at 37°; the yeast cells for 18 hours at 25 — 28° and *B. stearothermophilus* for 18 hours at 63 — 65°.

Several of the known modifications of the Gram staining method were used in the initial stages of this work, but the one finally adopted for the results herein reported is that of Hucker. The results obtained by different staining methods were quite similar.

Following collection of the bacteria, the organisms were washed several times by centrifugation in distilled water or physiological saline, the latter being used more frequently, although no marked difference in results was observed. The suspension was then divided into two portions, to one of which was added a concentrated solution of bile salts (Paul-Lewis Laboratories) so as to give a final concentration of about 2%. The cells were extracted in this solution at 60° according to the procedure of Henry a. Stacey (1946). Smears of the control and extracted cells were made and stained from time to time until all the cells in the bile-salt solution were gram-negative. This period varied from a few to 16 hours for *B. subtilis* and *B. stearothermophilus* to 36 — 48 hours for *Cl. welchii* and the *Saccharomyces*. The extracted cells were then again washed several times in physiological saline and divided into four portions. To one of these was added concentrated solutions of protein and formaldehyde to give a final concentration of these substances of 0.05% and 0.15% respectively, while to two of the others was added either the protein alone or formaldehyde alone. All solutions were maintained at pH 7.2. Smears of all four samples were stained at intervals. In order to avoid uncertainties in technique, particularly as regards heat fixation, all four smears were made on the same slide.

The proteins used included lysozyme prepared according to the method of Alderton a. Fevold (1946) and recrystallized 3—4 times; commercial preparations of salmine and clupein sulphates; aldolase prepared according to the method of Taylor, Green a. Cori (1948) and recrystallized 4 times. A few tests were also made with a commercial purified preparation of insulin, and with triosephosphate dehydrogenase prepared according to the method of Cori, Slein a. Cori, (1948) and recrystallized 5 times.

In one series of experiments crystalline ribonuclease was used in place of bile salts for the conversion of *M. lysodeicticus* and *B. subtilis* to the gram-negative state. Since the final results were similar to those obtained by the use of bile salts, the use of ribonuclease was discontinued. It seems worth noting, however, that ribonuclease appeared to be effective in converting some organisms, such as *B. stearothermophilus*, to the gram-negative state at room temperature. Dubos (1947) states that organisms become susceptible to the action of ribonuclease only after being killed, the suggestion being that the death of the cell is accompanied by some modifications of the bonds which link the magnesium ribonucleate of the Gram complex with proteins and other cellular constituents, so as to render the RNA more susceptible to the action of the enzyme.

RESULTS AND DISCUSSION

Examples of typical results obtained are shown in the accompanying photographs, figures 1 to 4, all taken at a magnification of about 1400. Although all possible combinations of bacterial strains and proteins were not tried, the number of tests made and the reproducibility of the results suggest that the conversion of an extracted cell to the gram-positive state by protein in the presence of formaldehyde is a fairly general phenomenon.

The degree of gram-positivity of the treated organisms is not always as intense as that of the original cells, the colour of the gram-stained preparations being occasionally violet to dark-violet in place of the original deep stain. This was especially true when the proteins used were triosephosphate dehydrogenase and insulin (see also below). We do not consider this as unusual since, in addition to the complex effects of bile-salt extraction or ribonuclease treatment (aside from the extraction of nucleic acids) the final treated cells obviously differ markedly in composition from the original ones.

In no instance did protein alone have any effect; while only in the case of *Cl. welchii* did formaldehyde alone result in the occasional appearance of a few gram-positive cells, an effect previously noted by Henry a. Stacey (1946), but quite unimportant as compared to the result with protein added.

It is to be noted that the concentration of protein employed for the conversion process is only about 10% that of the nucleic acid concentration used in the experiments of Henry a. Stacey (1946). The time required for converting the extracted cells to the gram-positive state varied with the particular combination of organism and protein used, but a definite change was usually visible within 20 — 30 minutes, while after 2 hours a large proportion of the cells was gram-positive.

In figure 3 (c), taken before all the cells had been restored to the gram-positive state, several of them may be seen to exhibit the presence of a number of granules which very much resemble those observed in the same organism by Georgi et al. (1951), using the HCl-Giemsa stain, both before and after lysis of the cells with lysozyme. These granules, of which there were up to 3 or 4 per cell, were the last to be decolorized during the process of extraction by bile-salt or treatment with ribonuclease, and first to take the Gram stain during reconversion to the gram-positive state with either protein or magnesium ribonucleate. We would not have considered this behaviour as different from that of the other organisms but for the fact that, following lysis with lysozyme, the free granules still took the Gram stain, although with slightly reduced intensity. Georgi at al. (1951) believe that these granules, which have been shown to be particularly rich in enzyme proteins, represent an instance of the isolation of a specific granule from a bacterial cell. The fact that they exhibit some degree of gram-positivity outside the cell membrane is in itself of some significance (Shugar, 1953) and suggests that they are worthy of further study.

Of some interest was the effect of protein and formaldehyde on the variable proportion of gram-negative cells usually found in cultures of *Cl. welchii* more than 3 — 4 hours old and *B. subtilis* more than 18 hours old, and due presumably to natural autolysis. The exposure of such autolysed *Cl. welchii* cells to protein and formaldehyde produced no change, whereas those of *B. subtilis* were all transformed to the gram-positive state, thus suggesting some difference in the mechanism of autolysis of the two organisms.

A further point of interest is the fact that the results obtained with a thermophilic organism cultivated at a temperature of 65° were completely analagous to these obtained for the mesophilic strains. We found that magnesium ribonucleate may also be used to restore the gram-positivity of bile-salt or ribonuclease treated thermophilic cells, so that the behaviour of these organisms parallels the many similarities in biochemical behaviour already known to exist between thermophilic and mesophilic organisms.

It has been shown (Webb, 1948) that heat-killed gram-positive cells which are transformed to the gram-negative state by the action of lysozyme, cannot be restored to the gram-positive state with magnesium ribonucleate as for bile-extracted cells. The strain of *B. subtilis* we used is converted to the gram-negative state, without lysis, at room temperature. These cells could not then be restored to the gram-positive state with protein and formaldehyde, a not unusual result in view of the effect of lysozyme on the cell membrane (even in the absence of lysis) and the known importance of the structural integrity of the cell wall on the Gram reaction (Benians, 1920), a factor which has been discussed in detail elsewhere (Shugar, 1953).

The results obtained with insulin, using *Cl. welchii* and *Saccharomyces* as test organisms, differed somewhat with respect to those exhibited by the other proteins. Under these circumstances the final appearance of the organisms was that of a weakly gram-positive cytoplasm surrounded by a darker gram-positive cell wall, the latter occasionally consisting of a string of granules, the entire picture being strongly suggestive of the effect obtained with a cell wall stain. As pointed out elsewhere (Shugar, 1953) this is precisely what one would expect if the site of the Gram reaction were largely or entirely confined to the cell wall. If, as suggested by Henry a. Stacey (1946), the site of the Gram stain in the natural state of both these organisms is confined to the cell wall, one would expect the cells to exhibit some such appearance during the course of their extraction with bile-salt or during their subsequent conversion to the gram-positive state with magnesium ribonucleate. This was not found to be the case in our experiments with magnesium ribonucleate nor is such a phenomenon apparent from the photographs of Henry a. Stacey (1946), as is to be expected from the observations of Lamanna (1951) and Lamanna a. Mallette (1950) who showed, by combining the Gram stain with the cell wall stain that both the cell wall and cytoplasm of yeast cells and *Cl. welchii* take the Gram stain. This is not meant to imply that there may not be organisms in which the Gram stain is limited to the cell wall. Churchman (1927) has reported that the central core of a strain of *B. anthracis* was not stained, while the periphery of the cells took the stain in a somewhat irregular manner. We have isolated from the air a strain of *B. subtilis* which stains only round the periphery. A good deal of confusion has developed around this point because of the tacit assumption that the mechanism and site of the Gram reaction is the same for all organisms (Shugar, 1953).

That the molecular weight of the proteins used in these experiments is not a very important factor is shown by the fact that a low-molecular weight

protein such as insulin appears to react at the cell periphery, while a high-molecular weight protein such as aldolase appears to stain the entire protoplasm.

Since bile salt and especially ribonuclease treatment removes most of the nucleic acid from the cells, the restoration of gram-positivity by means of protein is rather strong evidence that nucleic acids do not play an exclusive role in the Gram reaction. It is even possible that they do not play a predominant role, although our evidence on this point is not conclusive. There is, on the other hand, considerable evidence that they are involved to some extent. We are inclined to doubt the suggestion of Henry a. Stacey (1946) that the Gram complex necessarily involves some unique type of protein rich in arginine and -SH groups. Neither protamine, insulin, nor arginine possesses free -SH groups, aldolase possesses neither -SH groups nor is its arginine content abnormally high; while triosephosphate dehydrogenase, which does contain free -SH groups, gave results which were inferior to the other proteins.

Our findings are suggestive of the important role which proteins may play in the Gram reaction, although it is not possible to conclude from the above whether we are dealing with free proteins or complexes formed within the cell. Nor is the role of formaldehyde clear. Henry a. Stacey assume that its function is that of a reducing agent. But formaldehyde also reacts with the amino groups of proteins at neutral pH, thus increasing their acidity. However, this too is not a deciding consideration since we found in several experiments that formaldehyde could be replaced by cysteine, as noted by Henry a. Stacey (1946). The fact that proteins with such wide differences in molecular weights and isoelectric points are effective in the conversion process led us to investigate the possibilities of peptides, since here it may be easier to interpret the results. Preliminary trials with a few tripeptides appear to give some kind of positive results and are the subject of further study.

The problem of obtaining an unequivocal answer as to the nature of the Gram reaction is, in all likelihood, all the more elusive in that not only may a number of different cell components as well as physico-chemical factors be involved, but these probably vary from one organism to another. The restoration, by some particular substance, of the gram-positive state of a previously extracted organism does not, as was pointed out by Mitchell a. Moyle (1950), constitute proof that the gram-positive character of the normal, intact organism was due to the same cause. We are of the opinion that the best that can be said at the moment is that the fact that such substances as lipoids, nucleic acids and proteins have been used successfully to restore extracted gram-positive organisms to the gram-positive state, constitutes evidence that each of them may participate in the Gram reaction, but not necessarily to the exclusion of the others. We do feel it pertinent to add that our procedure using proteins is the only procedure which has proven equally effective in converting natural gram-negative

cells to the gram-positive state, either with or without prior ribonuclease or bile-salt treatment, whereas magnesium ribonucleate is ineffective in this regard (Shugar a. Baranowska, 1953). There are also a number of examples of gram-positive behaviour exhibited by proteins *in vitro* (see Shugar, 1953), as well as the demonstration by Braun (1951) that proteins bind triphenylmethane dyes.

D. Shugar i *J. Baranowska*

BADANIA NAD REAKCJĄ GRAMA. — ROLA BIAŁEK PRZY BARWIENIU METODĄ GRAMA

Streszczenie

Gramdodatnie drobnoustroje, przeprowadzone w postać gramujemną za pomocą ekstrakcji solami żółciowymi lub działania rybonukleazy, można z powrotem przemienić w formy gramdodatnie przez zadziałanie na nie rozcieńczonymi roztworami białek w obecności formaliny.

Jeden z badanych szczepów, termofil o optimum wzrostu przy 65°, zachowywał się tak samo jak drobnoustroje mezofilne. Podobnie również można było przywrócić u tego szczepu gramdodatniość za pomocą rybonukleinianu magnezu. Przemiana w postać gramujemną pod wpływem lyzozymu, bez wywołania lizy, okazała się nieodwrocalną. Autorzy poddali dyskusji wyniki badań oraz mechanizm reakcji Grama.

Д. Шугар и *Я. Барановска*

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД РЕАКЦИЕЙ ГРАМА. РОЛЬ БЕЛКОВ ПРИ ОКРАШИВАНИИ ПО МЕТОДУ ГРАМА

Резюме

Грамоположительные микроорганизмы, превращенные в грамотрицательные при помощи екстрагирования желчными солами или путем воздействия рибонуклеязы, можно обрятимо превратить в грамположительные формы путем воздействия на них разведенными растворами белков в присутствии формола.

Один из исследуемых штаммов, термофильная форма с оптимумом роста при 65°, вел себя так же, как и мезофильные микроорганизмы. Аналогично, можно было восстановить у этого штамма грамположительность при помощи рибонуклеиновокислого магния. Превращение в грамотрицательный вид под влиянием лизоцима, без вызывания лиза, оказалось необратимым.

Результаты исследований и механизм реакции Грамма подвергались обсуждению.

OBJAŚNIENIA DO TABL I

Fig. 1. *Cl. welchii*, stained by the Gram method: a) Following extraction of the cells with 2% bile salt at 60° for 36 hours, b) Following exposure of the cells in (a) to 0,05% protamine and 0,15% formaldehyde for 18 hours

Rys. 1. *Cl. welchii*, barwione metodą Grama: a) komórki po ekstrakcji 2% roztworem soli żółciowych w ciągu 36 godzin w temp. 60°, b) komórki ekstrahowane po zadziałaniu na nie 0,05% protaminą i 0,15% formolem w ciągu 18 godzin

Рис. 1. *Cl. welchii*, окрашенные по Граму: а) после 36-часовой экстракции клеток 2% раствором желчных солей при темп. 60°, b) экстрагированные клетки после 18-часового воздействия 0,05% протамином и 0,15% формолом

Fig. 2. *B. subtilis*, stained by the Gram method: a) Following extraction of the cells with 2% bile salt at 60° for 18 hours, b) Following exposure of the cells in (a) to 0,05% aldolase and 0,15% formaldehyde for 2 hours

Rys. 2. *B. subtilis*, barwione metodą Grama: a) komórki po 18-godzinnej ekstrakcji 2% roztworem soli żółciowych w temp. 60°, b) komórki ekstrahowane po zadziałaniu na nie 0,05% aldolazą i 0,15% formolem w ciągu 2 godzin

Рис. 2. *B. subtilis*, окрашенные по Граму: а) после 18-часовой экстракции клеток 2% раствором желчных солей при темп. 60°, b) экстрагированные клетки после 2-часового воздействия 0,05% альдолазой и 0,15% формолом

OBJAŚNIENIA DO TABL. II

Fig. 3. *B. stearothermophilus*, stained by the Gram method: a) Natural, untreated cells, b) Following extraction with 2% bile salt at 60° for 16 hours, c) Following exposure of the cells in (b) to 0,05% lysozyme and 0,15% formaldehyde for 2 hours and before they were completely gram-positive

Rys. 3. *B. stearothermophilus*, barwione metodą Grama: a) komórki normalne, b) komórki po 16-godzinnej ekstrakcji 2% roztworem soli żółciowych w temp. 60°, c) komórki ekstrahowane po zadziałaniu na nie 0,05% lyzozymem i 0,15% formolem w ciągu 2 godzin, zanim stały się ponownie zupełnie gramdodatnie

Рис. 3. *B. stearothermophilus*, окрашенные по Граму: а) нормальные клетки, b) клетки после 16-часовой экстракции 2% раствором желчных солей при темп. 60°, c) экстрагированные клетки после 2-часового воздействия 0,05% лизоцимом и 0,15% формолом. Клетки частично грамположительные

Fig. 4. *S. cerevisiae*, stained by the Gram method: a) Following extraction with 2% bile salt at 60° for 36 hours, b) Following exposure of the cells in (a) to 0,05% protamine and 0,15% formaldehyde for 18 hours

Rys. 4. *S. cerevisiae*, barwione metodą Grama: a) komórki po 36-godzinnej ekstrakcji 2% roztworem soli żółciowych w temp. 60°, b) komórki ekstrahowane po zadziałaniu na nie 0,05% protaminą i 0,15% formolem w ciągu 18 godzin.

Рис. 4. *S. cerevisiae*, окрашенные по Граму: а) после 36-часовой экстракции 2% раствором желчных солей при темп. 60°, b) экстрагированные клетки после 18-часового воздействия 0,05% протамином и 0,15% формолом

TABLE I

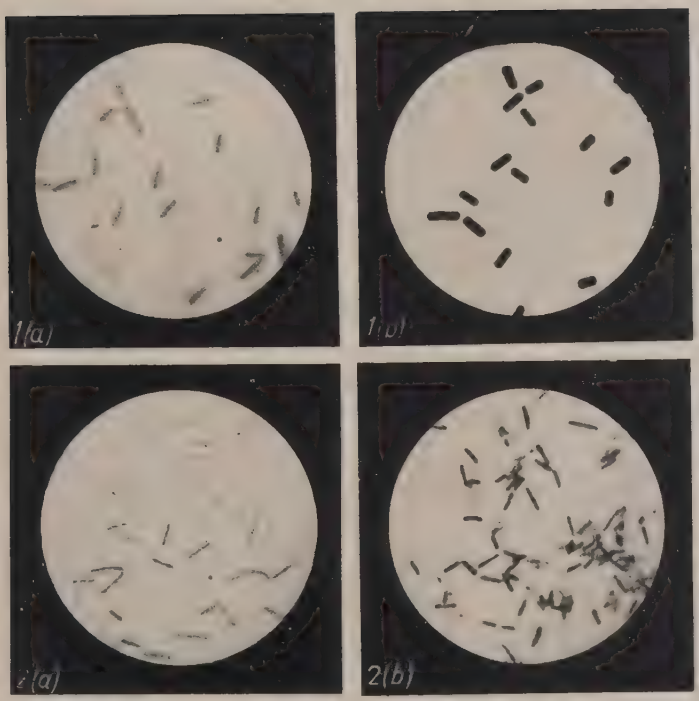
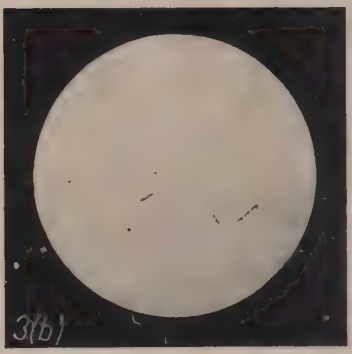
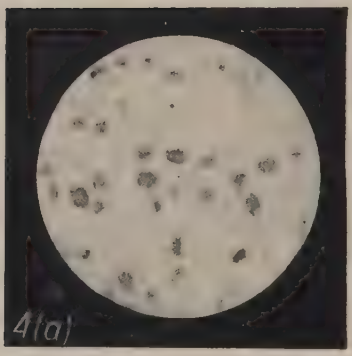


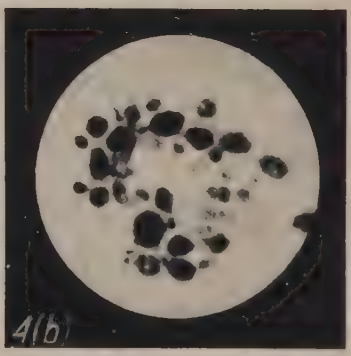
TABLE II

3(a)


3(b)

3(c)


4(a)


4(b)

BIBLIOGRAPHY

1. Alderton G. a. Fevold H L., 1946: Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **164**:1.
2. Bartholomew J. W. a. Umbreit W. W., 1944: Ribonucleic acid and the Gram stain. *J. Bact.*, **48**:567.
3. Benians T. H. C., 1920: A further investigation into the principles underlying Gram's stain, with special reference to the bacterial cell membrane. *J. Path., Bact.*, **23**:401.
4. Braun A. D., 1951: Wzajemne oddziaływanie białek z trójfenylometanowymi barwnikami. *Biochimia*, **16**:399.
5. Churchman J. W., 1927: The structure of *B. anthracis* and the reversal of the Gram reaction. *J. Exp. Med.*, **46**:1007.
6. Cori G. T., Slein M. W. a. Cori C. F., 1948: Crystalline d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *J. Biol. Chem.*, **173**:605.
7. Deletang R., 1933: Contribution à l'étude de la coloration de Gram. *Les Presses Modernes*, Paris.
8. Deussen E., 1918: Die Gramsche Bakterienfarbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung. *Z. Hyg. Infektionskrankh*, **85**:235.
9. Deussen E., 1920: Die Gramsche Bakterienfarbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung. *Biochem. Z.*, 103:123.
10. Deussen E., 1921: Die Gramsche Bakterienfarbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung. *Z. Hyg. Infektionskrankh.* **93**:512.
11. Dubos R. J., 1937: The autolytic system of pneumococci. *J. Exp. Med.*, **65**:873.
12. Dubos R. J., 1947: The Bacterial Cell. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
13. Georgi C. E., Militzer W., Burns L. a. Heotis J., 1951: On the existence of a cell granule in a thermophilic bacterium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**:598.
14. Guttstein M., 1925: Das Ektoplasma der Bakterien II. Über färberische Verschiedenheiten zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien. Ein Beitrag zur Theorie der Gramschen Farbung — *Zentralbl. f. Bakt.*, I Abt., Orig., **94**:144.
15. Henry H. a. Stacey M., 1943: Histochemistry of the gram staining reaction for microorganisms. *Nature*, **151**:671.
16. Henry H. a. Stacey M., 1946: Histochemistry of the gram staining reaction for microorganisms. *Proc. Roy. Soc.* (London), **133**:391.
17. Hottinger R., 1915: Beitrag zur Theorie der Färbung nach Gram: Kolloidchemisch-optische Gesichtspunkte. *Zentralbl. f. Bakt.*, I Abt., Orig. **76**:367.
18. Lamanna C., 1951: Direct cytological demonstration of gram staining substrate in the cell wall of bacteria and yeasts. *Bact. Proc.*, 40.
19. Lamanna C. a. Mallete M. F., 1950: The relation of the gram stain to the cell wall and the ribonucleic acid content of the cell. *J. Bact.*, **60**:499.
20. Mitchell P., a. Moyle J. 1950: Occurence of a phosphoric ester in certain bacteria: its relation to gram staining and penicillin sensitivity. *Nature*. **166**:218.
21. Schumacher J., 1928. Zur Gramschen Farbung Über die chemische Zusammensetzung der Lipoidsäure und über künstlich grampositiv gemachte Hefezellen. *Zentralbl. f. Bakt.*, I Abt., Orig. **109**:181.

22. Shugar D., 1953: Istota i mechanizm barwienia według Grama: Rozwój pojęć i teorii. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (in press).
23. Shugar D. a. Baranowska J., 1953: Studies on the Gram stain: Conversion of natural gram-negative organisms to the gram-positive state. *Bull. Acad. Polonaise des Sciences*, **1**, No. 3 (in press).
24. Tarasewicz L. M., 1947: Nowe dane odnośnie do metody barwienia Gramem. *Mikrobiologia*, **16**:245.
25. Taylor J. F., Green A. A. a. Cori G. T., 1948: Crystalline aldolase. *J. Biol. Chem.*, **173**:59.
26. Webb M., 1948: The action of lysozyme on heat-killed gram-positive micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.*, **2**:260.

T. Mierzejewski

BADANIA NAD SKŁADEM WĘGLOWODANOWYM EKTOPLAZMY *CORYNEBACTERIUM EQUI*

Z Zakładu Mikrobiologii Wet. i Epizoocjologii UMCS i Zakładu Chemii Fizjologicznej
Wydziału Weterynarii UMCS w Lublinie
Wpłynęło dn. 15.VII.1953 r.

Kwasoodporność, patogenność, zdolność wywoływania zmian chorobowych podobnych do spotykanych w gruźlicy, liczne cechy morfologiczne i hodowlane, zbliżające *Corynebacterium equi* do *Mycobacterium* mogą być przypuszczalnie zależne w pewnym stopniu od budowy i charakteru ektoplazmy. W związku z tym podjęto obecną pracę, której celem było określenie składu chemicznego węglowodanów ektoplazmy *Corynebacterium equi* metodą chromatografii bibułowej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał doświadczalny i metodyka

Do badań użyto spłuczyny wodnej 72 godzinnej hodowli agarowej *C. equi* szczep nr 3294 z Zakładu Mikrobiologii Wet. UMCS.

Spłuczynę (w ilości 20 ml na flaszkę Roux) wirowano i przemyto kilkakrotnie wodą destylowaną, masę bakteryjną odtłuszczano na zimno alkoholem, acetonem i eterem (Dubrowska 1950, 1951, Zabłocki 1951). Osad suszono w próżni w temp. 35°.

Ekstrakt alkoholowo-acetonowo-eterowy stanowił 8,2 — 9% wagi komórki. Ciała ługowane po odparowaniu rozpuszczalników cechuje balsamiczny zapach, przypominający woń pszczelego wosku. Wyciąg zawiera barwik oraz frakcję tłuszczowatą, w skład której wchodzą fosforolipidy.

Odtłuszczoną suchą masę bakteryjną podzielono na dwie części („a" i „b").

Z części „a" wyciągano cukry metodą kwaśnego odbiałczania.

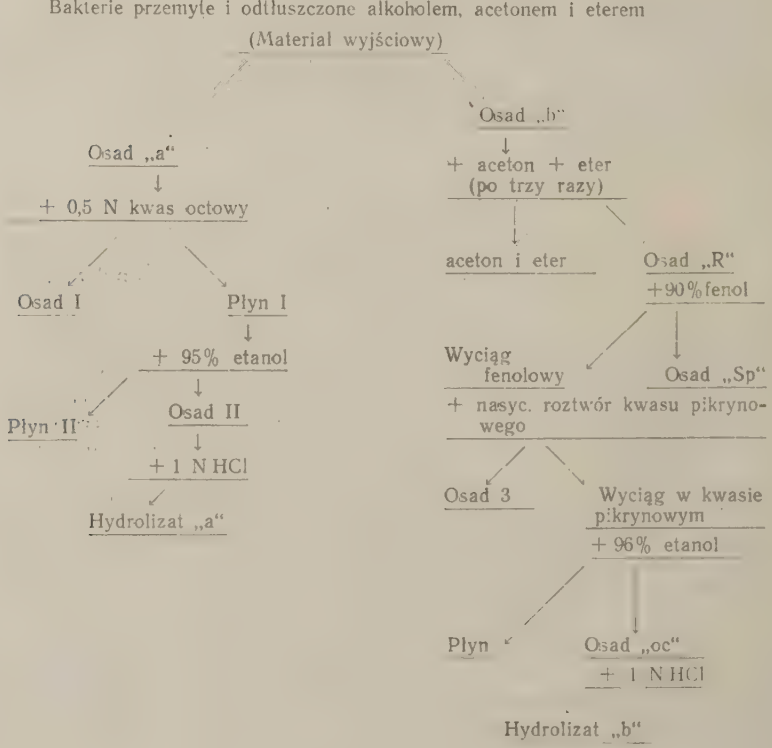
Część „a" ekstrahowano wrzącym 0,5 N kwasem octowym w stosunku 10:1 przez 25 minut w suszarce o temp. 120°. Po ostygnięciu ekstrakt wirowano, płyn znad osadu w celu wytrącenia cukrów zmieszano z 95% etanolem w stosunku 1 : 5. Po 24 godzinach oddzielono alkohol i kwas octowy od wytrąconego osadu przez wirowanie. Pozostałe śla-

dy kwasu octowego i alkoholu w osadzie usunięto przez odparowanie pod próżnią w temp. 25 — 30°.

Otrzymano suchy ekstrakt o wyglądzie żółtego proszku, który stanowił 13,5% wagi suchej masy bakteryjnej nie odtłuszczonej, a 15,7% odtłuszczonej. Proszek rozpuszcza się w wodzie po ogrzaniu, dając roztwór opalizujący, pH wodnego roztworu waha się między 5 — 6. Roztwór daje dodatnią próbę Molischa, słabododatnią z fluoroglucynolem i acetonowym roztworem azotanu srebra (Traveylan, Procter i Harrison) 1950). Ujemnie natomiast wypadły próby: Fehlinga, biuretowa Piotrowskiego, Millona i ksantoproteinowa. Na podstawie przeprowadzonych prób można przypuszczać, że badany osad jest wielocukrem.

Wielocukier ten hydrolizowano pod chłodnicą zwrotną w ciągu 12 godzin przy zastosowaniu 1 N HCl w temperaturze wrzenia. Otrzymano hydrolizat klarowny koloru jasnobrązowego, który po zobojętnieniu odparowano do sucha pod próżnią. Pozostałość ekstrahowano pirydyną w celu oddzielenia wolnych cukrów redukujących od nadmiaru soli. Rozdzielenie i identyfikację cukrów przeprowadzono metodą chromatografii bibułowej.

Schemat 1



Część „b" masy bakteryjnej dezintegrowano acetonem, z którego to dezintegratu cukry izolowano opierając się na metodzie Holdswortha (1951), którą wymieniony autor zastosował w badaniach nad cukrowcami ektoplazmy *C. diphteriae*. Dezintegrat w celu rozpuszczenia białka i aminokwasów zmieszano z 15-krotną ilością 90% fenolu i pozostawiono w temp. 30° na przeciąg 50 godzin.

Nierozpuszczalna w fenolu pozostałość po kilkakrotnym przemyciu etanolem i eterem oraz wysuszeniu pod próżnią daje w roztworze wodnym dodatni odczyn na białka i cukry (próby — biuretowa, ksantoproteinowa, ninhydrynowa i z α-naftolem).

Otrzymany sympleks białkowo-cukrowy w celu oddzielenia cukru potraktowano wrzącym nasyconym roztworem kwasu pikrynowego. Po ostygnięciu i odwirowaniu osad przemyto trzy razy wodą destylowaną. Wielocukier wytrącono z frakcji płynnej za pomocą 96% etanolu (w stosunku 1 : 5).

Po odwirowaniu i wysuszeniu otrzymano proszek koloru żółtozielonego, który stanowił 14% sympleksu. Proszek ten trudno rozpuszczał się na zimno w wodzie, dopiero po ogrzaniu dawał roztwór opalizujący o pH 5 — 6. Reakcje na białko i grupę aminową ujemne (próby — Piotrowskiego, Millona, ksantoproteinowa, ninhydrynowa). Ogólna próba na węglowodany Molischa dodatnia, z jodem i płynami Fehlinga ujemne.

Otrzymany w wyżej opisany sposób wielocukier zadano 1 N HCl i hydrolizowano pod chłodnicą zwrotną przez 16 godzin. Hydrolizat klarowny koloru jasnobrązowego po zobojętnieniu odsalano na drodze ekstrakcji pirydynowej, po czym badano metodą chromatografii bibułowej.

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA

Technikę chromatograficzną stosowano wg Consdena, Gordona i Martina (1944), Epsztajna i Fominy (1950), Mierzejewskiego i Skulimowskiego (1952). Używano bibuły Whatmana nr 1. Plamy cukrów uwidoczniano za pomocą acetonowego roztworu azotanu srebra, butanolowego roztworu aniliny, rezorcynolu oraz orcynolu (Bryson i Mitchel 1951). Jako rozpuszczalnik stosowano układ: pirydyna-butanol-woda w stosunku objętościowym 25 : 45 : 40 (Opieńska-Blauth i Madecka-Borkowska 1950). Układ ten umożliwia rozdzielenie cukrów redukujących o zbliżonym R_F bez potrzeby stosowania chromatografii dwuwymiarowej.

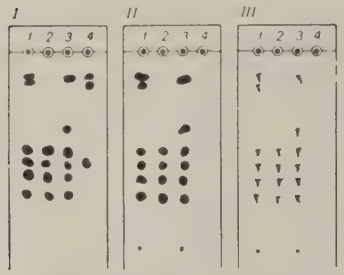
Doświadczenia przeprowadzono z roztworem wodnym dezintegratu „R", hydrolizatem „a", hydrolizatem sympleksu białkowo-cukrowego „Sp", hydrolizatem „b" oraz niehydrolizowanym sympleksem „Sp" i niehydrolizowanym wielocukrem z sympleksu „oc".

Na wstępie przeprowadzono doświadczenia z roztworami czystych pojedynczych cukrów i ich mieszaniną. Cukry wzorcowe dobrze rozdzielają się na zastosowanym układzie rozpuszczalników z wyjątkiem fruktozy, arabinozy i mannozy, które w mieszaninie dają na chromatogramie jedną wspólną plamę. Trudność tę starano się pokonać przez wywoływanie chromatogramów odczynnikami na pentozy i ketozy oraz przez użycie innych układów rozpuszczalników, jak fenol-woda w stosunku 1 : 1 i pirydyna-butanol-5% kwas trójchlorooctowy w stosunku 25 : 45 : 40. Test rezorcynolowy i orcynolowy pozwolił na przeprowadzenie identyfikacji ketoz i aldoz

oraz heksoz i pentoz. Użycie dwóch innych układów nie dało wyników zadowalających, nie otrzymano bowiem rozdzielenia fruktozy, arabinozy i mannozy. W układzie fenol – woda otrzymano plamę wspólną dla mannozy i ksylozy oraz arabinozy i fruktozy. Układ pirydyna - butanol - 5% kwas trójchlorooctowy daje tylko wyższe wartości R_F, nie doprowadza jednak do rozdzielenia wymienionych cukrów.

Ponieważ zauważono, że wartości R_F wahają się znacznie w zależności od temperatury i wysycenia komory chromatograficznej parami rozpuszczalników, dlatego w doświadczeniach, które miały na celu identyfikację cukrów w hydrolizatach, nie opierano się na wartości R_F, ale plamy hydrolizatu porównywano z plamami kontrolnych cukrów wkroplonych obok i łącznie z badanym hydrolizatem. Postępowanie to pozwala na przeprowadzenie identyfikacji w różnych warunkach temperatury i wysycenia komory parami rozpuszczalników oraz daje najpewniejszą identyfikację w metodzie chromatograficznej.

Tablica I



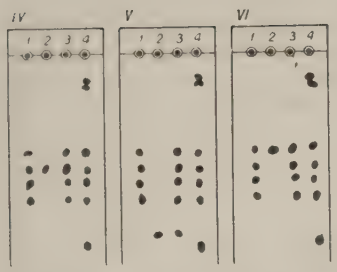
Chromatogram	I	II	III
Kropla 1	hydrolizat		„a"
Kropla 2	hydrolizat		„b"
Kropla 3	hydrolizat		„Sp"
Kropla 4	„R"	„oc"	„Sp"
Układ	pirydyna-butanol-woda		
Czas spływu	30 godzin		

Wywoływacz: azot. srebra orcynol rezorcynol

Porównując plamy dezintegratu „R" i hydrolizatów zauważyć można, że plamy dezintegratu pokrywają się z plamami (licząc od góry) 1, 2 i 4 hydrolizatu „a" oraz 1 i 4 hydrolizatu „Sp". Jednocześnie na chromatogramie III plamy koloru żółtobrązowego są dużo słabiej zarysowane, co świadczy o braku ketoz.

Trzeba podkreślić, że hydrolizat „a" otrzymano metodą kwaśnego odbiałczania, która umożliwia przede wszystkim wydzielenie cukrów wolnych z komórki bakteryjnej, nie związanych pod postacią sympleksu z białkiem bądź lipidami (Mikułaszek, 1951). Być może, że zastosowanie temperatury wrzenia przy odbiałczaniu spowodowało częściową hydrolizę sympleksów, co upodobniło obrazy chromatogramów hydrolizatów „a", „b" i „Sp". Na uwagę zasługuje fakt, że hydrolizat „b" wykazuje obecność czterech plam, które pokrywają się z plamami 3, 4, 5, 6 hydrolizatu „a" oraz 3, 4, 5, 6 hydrolizatu „Sp". Można przypuszczać, że trzy inne związki występujące w hydrolizacie „Sp" nie oddzielają się pod wpływem kwasu pikrynowego od cząsteczki białkowej bądź — z wyjątkiem plamy 7 — są produktem pośrednim hydrolizy. O tym, że plamy hydrolizatu „b" nie pochodzą z rozpadu plamy 1 i 2 hydrolizatu „a" oraz plamy 1 i 2 dezintegratu „R", przemawia brak tych plam na chromatogramach niehydrolizowanego wielocukrowca „oc" (chromatogram II, kropla 4).

Tablica II

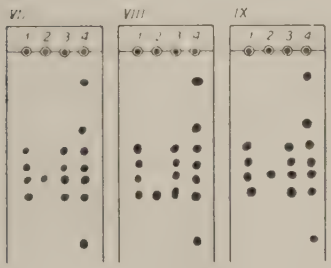


Chromatogram	IV	V	VI
Kropla 1	hydrolizat	„b"	
Kropla 2	glukoza	riboza	galaktoza
Kropla 3	hydrolizat	„b"	
Kropla 4	hydrolizat	„a"	
	+ glukoza	+ riboza	+ galaktoza
Układ	pirydyna — butanol — woda		
Czas spływu	30 godzin		
Wywoływacz	azotan srebra		

Wyniki analizy tablicy II przemawiają za obecnością w hydrolizacie „a" i w hydrolizacie „b" glukozy i galaktozy.

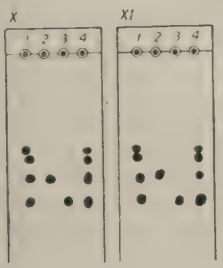
Przedstawiony na tablicy III wynik analizy hydrolizatu „b" i hydrolizatu „Sp" wykazuje obecność plam umiejscowionych na wysokości spływu ksylozy, mannozy bądź arabinozy. Dobrze różnicujący pentozy test orcynolowy w wypadku hydrolizatów okazał się niedostatecznie czułym, toteż w celu oddzielenia mannozy od arabinozy przeprowadzono doświadczenie na układzie fenol-woda w stosunku 1:1.

Tablica III



Chromatogram	VII	VIII	IX
Kropla 1	hydrolizat	„b"	
Kropla 2	mannoza	ksyloza	arabinoza
Kropla 3	hydrolizat	„b"	
Kropla 4	hydrolizat	„Sp"	
	+ mannoza	+ ksyloza	+ arabinoza
Układ	pirydyna — butanol — woda		
Czas spływu	30 godzin		
Wywoływacz	azotan srebra		

Tablica IV



Chromatogram	X	XI
Kropla 1	hydrolizat	„b"
Kropla 2	mannoza	mannoza
Kropla 3	arabinoza	arabinoza
Kropla 4	hydrolizat	„b"
	+ mannoza	+ arabinoza
Układ	fenol — woda	
Czas spływu	30 godzin	
Wywoływacz	azotan srebra	

Na podstawie tablicy III i IV należy przyjąć, że hydrolizat „b" zawiera ksylozę (tablica III) oraz arabinozę (tablica IV). Być może, występuje też w hydrolizacie i mannoza, której nie można zidentyfikować na stosowanych w niniejszej pracy układach, a to dlatego, że w układzie fenol-woda mannoza zatrzymuje się na wysokości spływu ksylozy, a w układzie pirydyna-butanol-woda i układzie pirydyna-butanol-5% kwas trójchlorooctowy na wysokości spływu arabinozy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W części doświadczalnej zostały przeprowadzone próby wyodrębnienia wielocukrów ektoplazmatycznych *C. equi* w celu rozdzielenia i zidentyfikowania ich składników.

Wykazano obecność wolnych cukrów we frakcji „a" *C. equi*. Jednakże metodą kwaśnego odbiałczania nie można otrzymać ilościowo wszystkich wielocukrów, które — jak twierdzi H o l d s w o r t h — są połączone bardzo silnie w ektoplazmie komórki bakteryjnej z białkiem. Wymieniony autor w badaniach nad cukrowcami ektoplazmy *C. diphteriae* zastosował metodę ekstrakcji dezintegratu bakteryjnego za pomocą fenolu (jako rozpuszczalnika białka i aminokwasów) oraz kwasu pikrynowego w celu rozbicia sympleksu białkowo-cukrowego.

W niniejszej pracy udało się za pomocą tej metody otrzymać sympleks wielocukrowobiałkowy, który określono na podstawie dodatniej próby Molischa i Piotrowskiego. 16-godzinna hydroliza tego sympleksu w 1 N kwasie solnym doprowadziła do rozpadu wielocukrowca na cukry redukujące płyn Fehlinga. Analiza chromatograficzna hydrolizatu wykazała obecność siedmiu plam redukujących acetonowy roztwór azotanu srebra i barwiących się na brunatno przy zastosowaniu butanolowego roztworu aniliny. Cztery plamy odpowiadały plamom kontrolnym glukozy, galaktozy, arabinozy i ksylozy.

Dalsze doświadczenia, przeprowadzone przy użyciu samego wielocukrowca wydzielonego z sympleksu roztworem kwasu pikrynowego po zhydrolizowaniu, dały wyniki nieco odmienne od wyżej opisanych. Porównując chromatogramy widzimy, że hydrolizat samego wielocukrowca daje cztery plamy z odczynnikiem redukującym i anilinowym, które odpowiadają plamom galaktozy, glukozy, arabinozy i ksylozy. Można przypuszczać, że trzy inne związki obecne w hydrolizacie sympleksu nie oddzielają się pod wpływem kwasu pikrynowego od cząsteczki białkowej bądź za wyjątkiem plamy położonej poniżej spływu ksylozy są produktem pośrednim hydrolizy.

Należy podkreślić, że podobny skład chemiczny wielocukrowca bakteryjnego stwierdził H o l d s w o r t h w materiale ektoplazmatycznym *C. diphteriae*. Wykazał on mianowicie obecność galaktozy, mannozy i arabinozy. Według tego autora glukozamina pozostaje związana z cząsteczką białkową. Na uwagę zasługuje fakt, że skład węglowodanowy ektoplazmy *C. equi*, określony w niniejszej pracy, jest podobny do składu ektoplazmy *C. diphteriae* i w jeszcze większym stopniu — do składu ektoplazmy *Mycobacterium* (glukoza, galaktoza, arabinoza i mannoza).

Skład węglowodanowy ektoplazmy, stosunkowo duża zawartość substancji tłuszczowych (8 — 9%) i silny związek komponenty cukrowej z białkową świadczy z jednej strony o pokrewieństwie chemicznym drobnoustroju z *Mycobacterium*, a z drugiej strony — z maczugowcem błonicy.

T. Межеевски

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД УГЛЕВОДНЫМ СОСТАВОМ ЭКТОПЛАЗМЫ *CORYNEBACTERIUM EQUI*

Резюме

1. Полученный при помощи фенолового метода полисахариднобелковый симплекс эктоплазмы *C. equi* после кислого гидролиза дает на хроматограммах семь пятен при применении реакции с азотнокислым серебром и анилином. Четыре пятна соответствуют контрольным пятнам глюкозы, галактозы, ксилозы и арабинозы.

2. Гидролизат полисахариднобелкового симплекса эктоплазмы дает на хроматограммах при употреблении систем пиридин-бутанол-вода, пиридин-бутанол — 5% трихлоруксусная кислота и при применении системы фенол-вода, пятна отвечающие галактозе, глюкозе, арабинозе и ксилозе. Эти пятна совпадают с четырьмя пятнами гидролизата полисахариднобелкового симплекса и четырьмя пятнами гидролизата полисахарида после кислого отбелковывания.

(Три соединения, имеющиеся на хроматограммах симплекса, а не выступающие на хроматограммах гидролизата одного лишь полисахарида, быть может, не отделяются от белкового компонента под влиянием пикриновой кислоты, или, за исключением пятна, расположенного ниже сплыва рибозы, представляют собой посредственный продукт гидролиза).

3. Из промытых и высушенных бактерий *C. equi*, после экстракции в холодном состоянии при помощи алкоголя, ацетона и эфира, получено краску и жироподобную фракцию, составляющие 8—9% веса клетки. Жироподобная фракция содержит фосфоролипиды.

T. Mierzejewski

STUDIES ON THE POLYSACCHARIDES OF ECTOPLASMA OF *CORYNEBACTERIUM EQUI*

Summary

The polysaccharide combined with protein was isolated by treating *C. equi* cells with phenol. The products of hydrolyzis of this polysaccharide were examined by paper-chromatography method.

Solvents used: piridine-butanol-water, piridine-butanol-5% trichloracetic acid and phenol-water.

Four spots were identified as spots of glucose, galactose, xylose and arabinose.

Three spots found on the chromatograms of polysaccharide-protein complex could not be identified.

By cold extraction of *C. equi* cells by ethanol, acetone and ether the yellow pigment and the lipoid fraction were received.

These fractions formed 8—9 per cent of dry mass of cells.

LITERATURA

1. Bryson J. L. a. Mitchel J. T., 1951: Improved Spraying Reagents for the Detection of Sugars on Paper Chromatograms, *Nature* **167**:864.
2. Consden R., Gordon A. a. Martin A. J. P., 1944: Quantitative Analysis of Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper, *Biochem. J.*, **38**: 224.
3. Dubrowska I. I., 1950: Antygieny *Brucella suis*, Wydielenje, oczistka i chimiczeskaja charaktieristika, *Biochimia*, **15**:490.
4. Dubrowska I. I., 1951: Gidroliz antigiennowo kompleksa *Brucella suis* i chimiczeskaja priroda komponientow, *Biochimia*, **16**:41.
5. Epsztajn J. A., Fomina M. P., 1950: Koliczestwiennoje razdielenje kreatinina, kreatina i kreatinfosfata na bumagie, *Biochimia*, **15**: 32.
6. Holdsworth R. S., 1951: A Polysaccharide Isolated from *Corynebacterium diphteriae*, *Biochem. J.*, **49**: 1.
7. Mierzejewski T. i Skulmowski J., 1952: Wykrywanie i rozdzielanie aminokwasów w hydrolizatach białkowych soi metodą chromatografii bibułowej, *Annales U. M. C. S. S. DD* 6:309.
8. Mikulaszek E., 1951: Immunologicznie czynne wielocukrowce, Kraków.
9. Opieńska-Blauth J. i Madecka-Borkowska I., 1950: Rozdzielanie cukrowców o zbliżonym współczynniku R_F z mieszanin metodą chromatografii bibułowej, *Acta Phys. Pol.* vol. I, fasc. 2, 3: 134.
10. Travelyan W. Z., Procter J. S. a. Harrison J. S., 1950: Dedection of Sugars by Paper Chromatograms, *Nature* **166**: 444.
11. Zabłocki P., 1951: Chemia bakteryjna, Łódź.

Acta Microbiologica Polonica Vol. III, No 1

Wł. Błaszczak

BADANIA NAD SKUTECZNOŚCIĄ DZIAŁANIA ŚRODKÓW DEZYNFEKCYJNYCH (FORMALINA, SUBLIMAT) NA ŻYWOTNOŚĆ SKLEROT *RHIZOCTONIA SOLANI* KUEHN

Z Zakładu Fitopatologii WSR w Poznaniu

Wpłynęło dnia 2.V.1953 r.

WSTĘP

Rhizoctonia solani Kuehn (*Hypochnus solani* Prill. et Del., *Corticium solani* Burd. et Galz.) powoduje m. in. chorobę ziemniaków tzw. ospowatość kłębów (rizoktonioza ziemniaków). Choroba ta wywołuje straty przez to, że uszkadza i zabija kiełki wschodzących ziemniaków (Bondarcewa-Monteverde 1946, „Ochrona Roślin" 1953), a latem powoduje suchą zgniliznę podstawy łodyg. Choroba przenosi się głównie za pomocą sklerot (Cristinzio 1937, Bondarcewa-Monteverde 1946, Winter 1950), które występują na powierzchni „ospowatych" sadzeniaków. Ponadto grzyb ten żyje saprofitycznie we wszystkich naszych glebach i w pewnych warunkach może zmieniać tryb życia na pasożytniczy (Naumow 1952). Zaprawianie sadzeniaków ospowatych różnymi środkami odkażającymi stanowi jedną z metod zwalczania rizoktoniozy. W pracy tej badano skuteczność działania formaliny i sublimatu na żywotność sklerot *R. solani* w związku z ich wielkością i z czasem działania zaprawy.

Celem badań było znalezienie najskuteczniejszej zaprawy.

PRZEGLĄD LITERATURY

Zaprawianie kłębów ziemniaczanych nie zawsze daje pozytywne wyniki. Leszczenko (1935) dobre wyniki otrzymał przez zastosowanie 0,1% sublimatu przez $1^1/_2$ godziny albo 0,125% Uspulunu. Sanford (1936) stwierdził korzystny wpływ zaprawiania w 91% doświadczeń, a Peklo (1941) uzyskał zwyżkę plonu ziemniaków przez zastosowanie zaprawy formalinowej na gorąco. Jednakże inni badacze uzyskali wyniki niezadowalające. Np. Chamberlain (1932) wykonał 9 prób z zastosowaniem sublimatu zakwaszonego, z czego tylko w dwóch wypadkach stwierdził zwyżkę plonu.

W badaniach laboratoryjnych stwierdzono duże różnice w strukturze tkanki sklerot *R. solani* (the Mich. Agr. Exp. St. Rep., 1936) i w tym, jak się zdaje, leży przyczyna zmienności rezultatów otrzymanych przy stosowaniu chemicznego zaprawiania kłębów. Innym momentem o jeszcze większym znaczeniu aniżeli struktura sklerot jest ich wielkość. Sanford i Marritt (1933) wykazali, że zaprawa o wiele szybciej zabija małe aniżeli duże skleroty. Np. 0,8% formalina zabijała wszystkie skleroty małe po 90 minutach, średnie po 180 i duże po 270 minutach. Sublimat (0,12%) był skuteczniejszy aniżeli formalina. Sublimat zakwaszony zabijał skleroty małe po 3 minutach, a średnie po 5 minutach. Widzimy więc, że struktura sklerot i ich wielkość decyduje o tym, jak długo powinniśmy je wystawić na działanie zapraw, by zabieg ten był skuteczny.

BADANIA WŁASNE

W pracy tej zastosowano następujące zaprawy:

— formalina 0,8% — na zimno (temp. pokojowa), czas działania: 2 godz., 3 godz., 4 godziny.

— formalina 0,8% o temp. 50°, czas działania: $2^1/_2$ minuty, 5 minut i 8 minut.

— sublimat 0,1% — czas działania: $1^1/_2$ godz., 2 godz. i 3 godz.

— 0,2% sublimat zakwaszony (z 1% dodatkiem kwasu solnego stężonego ch. cz.), czas działania: 3 minuty, 6 minut i 10 minut.

Kłęby ziemniaczane pokryte sklerotami *R. solani* przechowywano do 6.II.52 r. w piwnicy o temperaturze około 7°, a następnie do 3 marca w temperaturze 3,5°. Wówczas podzielono je na 13 grup i poddano zaprawieniu z wyjątkiem grupy kontrolnej. Poszczególne partie złożono do zlewek trzylitrowych i zalano zaprawą. Temperatura środków dezynfekcyjnych w czasie zaprawiania wynosiła 21,5°. Po upływie określonego czasu zaprawę odlano, a kłęby wyłożono na stół i przykryto suchymi, czystymi ręcznikami. Zaprawianie formaliną na gorąco przeprowadzono na łaźni wodnej, a kłęby po zaprawieniu przykryto mokrymi ręcznikami. Po upływie 12 godzin zdjęto skleroty z zaprawionych kłębów za pomocą skalpela. Następnie podzielono je na 3 grupy: skleroty małe — 1-2 mm, średnie 2-3,5 mm i duże 3,5-5 mm i oddzielnie złożono do probówek. Do pracy użyto pożywki agarowo-maltozowej (20 g agaru i 20 g maltozy na 1 litr pożywki) o pH około 6. Skleroty przed złożeniem na pożywkę zanurzano na 3 sekundy do 0,1% sublimatu, a następnie płukano w wodzie sterylizowanej w 3 kolejnych naczyniach.

W każdej kombinacji poddano badaniu 68 — 72 skleroty, w czym od 24 do 30 małych 24 — 30 średnich i przeciętnie 15 dużych. Skleroty po złożeniu na pożywkę trzymano w temperaturze pokojowej.

Pierwszą obserwację wzrostu grzyba przeprowadzono po upływie 48 godzin, następne po 72 i 96 godzinach, natomiast ostatnią wykonano po upływie 6 dni. W wypadkach wątpliwych zastosowano badanie mikroskopowe. Stwierdzono, że pewna ilość sklerot, szczególnie poddanych działaniu sublimatu zakwaszonego, wyrosła dopiero po 6 dniach. Natomiast Sanford i Marritt (1933) prowadzili obserwacje tylko przez 4 dni, uważając, że jest to termin wystarczający do stwierdzenia żywotności sklerot.

UZYSKANE WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych badań zebrano w tabeli I.

Z tabeli wynika, że najłatwiej ulegają zabiciu skleroty małe, następnie średnie, a najtrudniej skleroty duże. Bardzo wyraźnie wystąpiło to w kombi-

Tabela I

Skuteczność działania stosowanych zapraw na żywotność sklerot *R. solani* K

Эффективность действия применяемых дезинфектантов на жизнеспособность склероций *R. solani* K

The effect of applied desinfectants on vitality of sclerotia of *R. solani* K

Nr kombinacji	Zaprawa	Czas działania zaprawy	Wielkość sklerot	Procent sklerot żywych po zaprawianiu	Procent sklerot żywych z ogółu sklerot w kombinacji
1	Sublimat 0,1%	1½ godziny	małe średnie duże	3,3 3,3 40,0	8,5
2	Sublimat 0,1%	2 godziny	małe średnie duże	0,0 4,1 22,7	8,5
3	Sublimat 0,1%	3 godziny	małe średnie duże	0,0 3,3 22,2	4,3
4	Sublimat 0,2% z 1% dodatkiem kwasu solnego	3 minuty	małe średnie duże	10,0 16,6 42,8	19,1
5	Sublimat 0,2% z 1% dodatkiem kwasu solnego	6 minut	małe średnie duże	10,0 0,0 11,1	6,9
6	Sublimat 0,2% z 1% dodatkiem kwasu solnego	10 minut	małe* średnie duże	2,7 16,6 9,0	8,4
7	Formalina 0,8% na zimno	2 godziny	małe średnie duże	4,1 13,3 38,8	16,6
8	Formalina 0,8% na zimno	3 godziny	małe średnie duże	0,0 3,3 6,6	2,9
9	Formalina 0,8% na zimno	4 godziny	małe * średnie duże	8,3 4,1 10,0	7,1
10	Formalina 0,8% o t° 50°	2½ minuty	małe średnie duże	13,3 33,3 31,2	24,3
11	Formalina 0,8% o t° 50°	5 minut	małe średnie duże	0,0 29,1 23,8	17,3

nacji 4 z sublimatem zakwaszonym, gdzie po 3-minutowym działaniu zaprawy pozostało sklerot żywych: małych 10,0%, średnich 16,6% i dużych 42,8%. Podobnie ułożyły się wyniki w kombinacji 7 z formaliną na zimno. W innych kombinacjach zjawisko to znalazło również potwierdzenie, chociaż w niektórych z nich wystąpiły pewne odchylenia, jak np. w kombinacji 6. Przyczyną tych „nieprawidłowości" mogła być różnica w strukturze sklerot, a także w ich grubości. W żadnej kombinacji nie nastąpiło zabicie wszystkich sklerot.

Czas działania zaprawy jest również ważnym czynnikiem wpływającym na jej skuteczność. Stosowane najkrótsze czasy zaprawiania wykazały największy procent sklerot żywych, który znacznie się zmniejszył przy zastosowaniu czasów średnich (z wyj. komb. 2). Czasy najdłuższe, jakie stosowano, nie dały specjalnie wyróżniających się wyników.

Sublimat, formalina na zimno i sublimat zakwaszony wykazały prawie jednakowe działanie zabójcze. Zaprawianie zakwaszonym sublimatem przez 3 minuty dało wynik niezadowalający, bo pozostawiło 19,1% sklerot żywych. Najsłabiej działała formalina w temp. 50°. Po $2^1/_2$ minutowym traktowaniu pozostało 24,3% sklerot żywych, a przedłużenie czasu działania do 5 i 8 minut wpłynęło nieznacznie na zwiększenie skuteczności.

Wynika z tego, że zalecane ogólnie sposoby zaprawiania kłębów przeciw rizoktoniozie ziemniaków są niezupełnie odpowiednie. By zaprawianie było skuteczne, trzeba by zabieg ten poprzedzić odpowiednią próbą w odniesieniu do materiału sadzeniakowego, jaki zamierza się zaprawiać, i dopiero na tej podstawie zastosować właściwy czas i sposób dezynfekcji.

Spośród sklerot pozostałych przy życiu po zaprawieniu największą siłę rozwoju (ocenioną na podstawie szybkości wzrostu grzybni) wykazały skleroty po zaprawianiu formaliną na zimno i w temp. 50°. Słaba siła rozwoju cechowała skleroty po działaniu sublimatu niezakwaszonego i zakwaszonego.

Dodatkowo przeprowadzone obserwacje wschodów na 16 kłębach ziemniaczanych w każdej kombinacji wykazały, że najlepsze i najbardziej wyrównane wschody dały kłęby po zaprawieniu formaliną na zimno. Natomiast w pozostałych kombinacjach zanotowano lekkie opóźnienie wschodów, szczególnie w kombinacjach po formalinie na gorąco a także po sublimacie niezakwaszonym.

Zagadnienie wpływu zaprawiania kłębów na zdrowotność kiełków i plonowanie ziemniaków jest przedmiotem dalszych badań.

WNIOSKI

Otrzymane wyniki pozwalają wyprowadzić następujące wnioski:

1) Skuteczność działania zaprawy na skleroty *R. solani* zależy od wielkości sklerot i czasu działania zaprawy.

2) Najlepszym środkiem dezynfekcyjnym okazał się sublimat w roztworze 0,1% oraz formalina 0,8% stosowana na zimno. Sublimat zakwaszony był nieco mniej skuteczny.

3) Zalecane powszechnie sposoby zaprawiania (czas stosowania zapraw) sadzeniaków ospowatych należy traktować w świetle tego doświadczenia jako wskazania orientacyjne, które trzeba każdorazowo dostosować do stopnia i jakości porażenia zaprawianego materiału sadzeniakowego.

В. Блащак

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ (ФОРМАЛИН, СУЛЕМА) НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СКЛЕРОЦИЙ *RHIZOCTONIA SOLANI*

Резюме

В настоящей работе исследовано токсическое влияние на склероции *Rhizoctonia solani*, в зависимости от их величины, 0,1% раствора сулемы, 0,2% раствора сулемы с прибавлением 1% соляной кислоты и 0,8% формалина в комнатной температуре и в температуре 50°.

Все выше указанные способы протравления были проведены в трех промежутках времени, из которых самым кратким был обычно рекомендуемый для практики. Склероции были разделены на три группы по размерам тела: малые (1—2 мм), средние (2—3,5 мм) и большие (3,5—5 мм). В качестве среды был применен агар с мальтозой при pH 6 и температуре около 21°.

Получено следующие результаты:

1. После протравления 0,1% раствором сулемы через 1½ часа оказалось живых склероций: малых 3,3% и больших 40,0%. Применены дезинфектанты действующие в течение более продолжительного времени в общем дали лучшие результаты.

2. Раствор 0,1% сулемы, холодный 0,8% раствор формалина и 0,2% раствор сулемы с прибавлением 1% соляной кислоты оказывали почти одинаковое токсическое влияние. Применение 0,8% раствора формалина в температуре 50° оказалось неблагополучным; в этом случае осталось в живых 20% склероций.

3. Во всех комбинациях не произошло полное уничтожение склероций. 88,5% контрольных склероций сохранили полную жизнеспособность.

Wł. Błaszczak

THE EFFECT OF DESINFECTANTS (FORMALDEHYDE, MERCURIC CHLORIDE) ON THE VITALITY OF SCLEROTIA OF *RHIZOCTONIA SOLANI* KUEHN.

Summary

In this study the relative effectiveness of nonacidified 0,1%, and acidified 0,2% mercuric chloride, and cold 0,8% and hot (50°) 0,8% formaldehyde solutions in killing of various sizes sclerotia of *Rhizoctonia solani* was examined. The following results have been obtained:

1. The effectiveness of desinfectants depends upon the sizes of sclerotia and the period of treatment. After 1½ hours mercuric chloride 0,1% treatment, 3,3% of the small sclerotia and 40,0% of the large ones were viable. The desinfectants applied during longer time periods gave in general better results.

2. The toxical effectiveness of nonacidified 0,1% mercuric chloride, of cold 0,8% formalin and acidified 0,2% mercuric chloride (with addition of 1% HCl) was nearly equal. The effectiveness of 0,8% hot formaldehyde at 50° was unsatisfactory. 20% of sclerotia remained viable.

3. In no combination all sclerotia were killed.

4. Sclerotia in checks showed the vitality of 88,5 percentage.

LITERATURA

1. Bondarcew A. S. i Bondarcewa-Montewerde, 1941: O czornoj parsze — *Rhizoctonia solani* Kuehn na kartofiele w swiazi s sowriemiennymi mietodami jego razwiedienia, Volume of Scientific Works, Leningrad, *USSR Acad. Sci.* (wg. RAM 1948, 27: 36).
2. Bondarcewa-Monteverde, 1941—43: Niekotoryje ekspierimientalnyje dannyje o wlijanii *Rhizoctonia solani* Kuehn na urożaj kartofiela, Volume of Scientific Works, Leningrad, *USSR Acad. Sci.* 1946 (wg RAM 1948, 27: 37).
3. Chamberlain E. E., 1932: Corticium disease of Potatoes. *New Zealand Journ. of Agric.* **44** (wg RAM 1932, **11**: 534).
4. Cristinzio M., 1937: Esperienze intorno alla capacita infettiva della *Rhizoctonia solani* Kuehn a mezzo di tuberi di Patata infetti. Ric. Ossvz Divulg. fitopat Campania ed Mezzogiorno (Portici) 6 (wg RAM 1948, 27:133).
5. Leszczenko P., 1935: *Rhizoctonia solani* K. *(Hypochnus solani* P. et D.) na ziemniakach. Prace Wydz. Chorób Roślin Państw. Inst. Nauk. Gosp. Wiejsk. w Bydgoszczy, 14 (wg. RAM 1935, **14**: 527).
6. Naumow N. A., 1952: Bolezni sielskochaziajstwiennych rastienij. Moskwa — Leningrad.
7. Ochrona roślin, 1953: P. W. R. i L. Warszawa.
8. Peklo J., 1941: Z boje proti infekcnim chorobom Bramboru: strupovitosti, vlockovitosti a plisni Bramborowe, *Zem. Arch.* 32: 9—10,: 505 (wg RAM 1947, 26: 508)
9. Report of the Michigan Agricultural Experiment Station for the two years ended June 30, 1936 (wg RAM 1937, **16**: 158).
10. Sanford G. B. a. Marritt J. W., 1933: The toxicity of formaldehyde and mercuric chloride solutions on various sizes of sclerotia of *Rhizoctonia solani. Phytopathology,* **23**: 271.
11. Sanford G. B., 1936: Studies on *Rhizoctonia solani* Kuehn I Effect of potato tuber treatment on stem infection six weeks after planting. *Sci. Agric.* 17 (wg RAM 1937, **16**: 338).
12. Winter G., 1950: Untersuchungen über Oekologie von *Rhizoctonia solani* in natürlichen Boden. *NachrBl. dtsch. PflSchDienst* (Braunschw.) 2,1 (wg RAM 1951, 29:287).

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

zawiadamia

o wydawaniu kwartalnika

POSTĘPY HIGIENY I MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ

Organ Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk

Czasopismo stanowi kontynuację wydawanych od roku 1949 pod redakcją prof. dra L. Hirszfelda roczników naukowych pod tym samym tytułem. Zawiera prace poglądowe, oraz zbiorowe referaty o charakterze syntetycznym i krytycznym, poruszające współczesną problematykę higieny i medycyny doświadczalnej, biologii i nauk pokrewnych ze szczególnym uwzględnieniem metod badawczych. Zapoznaje czytelników z najpoważniejszymi osiągnięciami tych nauk w kraju i za granicą. Jest przeznaczone dla pracowników naukowych, oraz lekarzy, weterynarzy, farmaceutów, chemików, teoretyków jak i praktyków interesujących się rozwojem nauk medycznych.

Prenumerata roczna zł 48.—

Prenumeratę czasopism naukowych Polskiej Akademii Nauk i Towarzystw naukowych przyjmuje: Centralna Ekspedycja PPK RUCH Warszawa, Srebrna 12, na konto PKO 1-110-28504 oraz od 11 maja do 10 czerwca 1954 r. listonosze i wszystkie Urzędy Pocztowe.

Informacje, katalogi, prospekty:

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Warszawa, Krakowskie Przedmieście 79.

Wł. Ostrowski

ZASTOSOWANIE METOD MIKROBIOLOGICZNYCH DO ANALIZY BIOCHEMICZNEJ

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ К БИОХИМИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ

MICROBIOLOGICAL METHODS FOR ASSAYING VITAMINS AND AMINOACIDS

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie
Wpłynęło dn. 4.VII.1953 r.

Jednym z momentów umożliwiających wykorzystanie mikroorganizmów do celów analitycznych było poznanie składu chemicznego tych drobnoustrojów. Już w r. 1881 nasz wielki rodak, Marceli Nencki wykazał, że bakterie mogą żyć na pożywkach syntetycznych. W 1897 roku Winogradski wypowiedział zdanie, że „bakterie wydają się żywymi nosicielami odczynników chemicznych". Omeliański (1924) w pracy pt. *Mikroorganizmy jako odczynniki chemiczne* dał zasadnicze podstawy do stosowania drobnoustrojów w analizie chemicznej.

Zastosowanie metod mikrobiologicznych do analizy chemicznej dało możność zaobserwowania wielu faktów naukowych, mających duże znaczenie dla biochemii i mikrobiologii. Między innymi stwierdzono, że bakterie – podobnie jak zwierzęta – potrzebują do swego rozwoju tych samych witaminów, aminokwasów i innych składników.

Witaminy kompleksu B można podzielić na dwie grupy: takie, których charakter witaminowy wykazano najpierw na zwierzętach (tiamina, ryboflawina, pirydoksyna, cholina) oraz te, których rolę w przemianie materii wykazano najpierw na mikroorganizmach, a później dopiero wyniki przeniesiono na świat zwierzęcy (inozytol, kwas pantotenowy, biotyna, niacyna, kwas p-aminobenzoesowy, pirydoksal, pirydoksamina).

Niedawno udało się za pomocą bakterii zidentyfikować różne odmiany kwasu foliowego występującego w produktach naturalnych, a w czterech ostatnich latach za pomocą pewnych szczepów bakterii mlekowych wyizolowano witamin B_{12} (Koniuszy, 1948) i tzw. kwas folinowy (*Citrovorum Factor*, Scheid i Schweigert, 1950), czynniki o niezmiernie doniosłym znaczeniu praktycznym. Niektóre gatunki bakterii mają wprost nieocenioną wartość przy izolowaniu różnych czynników wzrosto-

wych, gdyż specyficzność i czułość tego rodzaju testów nie da się zastąpić żadną inną metodą.

Dzięki tym pracom istnieje dzisiaj możliwość oznaczania wszystkich znanych witaminów rozpuszczalnych w wodzie i niektórych rozpuszczalnych w tłuszczach oraz pierwiastków śladowych za pomocą różnych typów mikroorganizmów, jak bakterie, drożdżaki, grzybki i glony.

Pierwszą metodę mikrobiologicznego oznaczania ryboflawiny opracowali S n e l l i S t r o n g w 1939 roku. Do tego celu użyli jednego ze szczepów bakterii mlekowych, gdyż jak się okazało, bakterie te najlepiej nadają się do tego rodzaju analiz. Początkowo była to metoda dająca duży procent błędu, lecz w miarę badań i udoskonalania techniki stała się metodą o dużym znaczeniu praktycznym.

Aż do czasu poznania metody mikrobiologicznej do oznaczania witaminów stosowano najczęściej metody biologiczne, polegające na wywołaniu awitaminozy u wyższych zwierząt i badaniu wpływu badanej substancji na te zwierzęta. Pomijając fakt, że metody biologiczne są znacznie kosztowniejsze, należy podkreślić, że dokładność tego rodzaju oznaczeń jest bardzo zmienna, mają więc one raczej charakter porównawczy. Ponadto w metodach biologicznych na dany czynnik reaguje jeden lub kilka osobników. W przypadku natomiast stosowania metod mikrobiologicznych uzyskana wartość jest średnią statystyczną reakcji wielu milionów organizmów. Wreszcie najważniejszym może faktem przemawiającym na korzyść metod mikrobiologicznych jest to, że pod względem czułości nie dorównuje im żadna inna stosowana dotychczas metoda. Czułość ich waha się w granicach od 10^{-6} do 10^{-10} g (dla B_{12} przy użyciu *Euglena gracilis* od 10^{-12} do 10^{-15} g).

Metoda mikrobiologiczna oddaje nieocenione usługi przy badaniu poziomu witaminów w płynach ustrojowych i różnych produktach naturalnych, gdzie występują one w minimalnych ilościach.

Metody mikrobiologiczne przeciętnie dają $\pm$ 10% błędu. L o w r y i B e s s e y (1944) wykazali, że przy zastosowaniu odpowiedniej techniki błąd przy oznaczaniu np. ryboflawiny można zmniejszyć do 0,7 — 1,2%. Zaznaczyć należy, że stosowanie do oznaczania niektórych witaminów metod chemicznych, polegających najczęściej na fluorometrycznym oznaczaniu pochodnych danego witaminu, jest obarczone prawie takim samym procentem błędu, przy czym najmniejsze ilości materiału potrzebne do oznaczenia są znacznie większe, niż to ma miejsce w metodach mikrobiologicznych. Tak więc do mikrobiologicznego oznaczania składu aminokwasowego jakiegoś białka wystarcza ok. 20 mg próbki.

Częstym źródłem błędów jest zmienność drobnoustrojów. Zmian pewnych cech nie jesteśmy w stanie przewidzieć, gdyż zależą one od najprzeróżniejszych czynników, często trudnych do ustalenia. Np. szczep, który reagował jedynie na l-aminokwasy, nagle zaczyna zużytkowywać również d-formy. Zjawisko to można wyzyskać do oznaczania obu optycznych antypodów aminokwasów (D u n n a t a l.).

Metoda ilościowego oznaczania tzw. czynników wzrostowych za pomocą bakterii opiera się na tym, że każdy szczep bakterii mlekowych potrzebuje do swego rozwoju, oprócz innych składników organicznych i nieorga-

nicznych, pewnych witaminów lub aminokwasów, których sam nie potrafi sobie zsyntetyzować i przy braku których nie może się rozwijać (por. tab. I).

Przy wykonywaniu oznaczenia postępujemy następująco: sporządzamy pożywkę syntetyczną, która zawiera wszystkie składniki potrzebne do rozwoju danego szczepu, z wyjątkiem tego, którego poziom chcemy oznaczyć. Następnie do określonej ilości tej pożywki dajemy rozcieńczenie materiału badanego, szczepimy pożywkę odpowiednim szczepem bakterii, inkubujemy w termostacie i w końcu mierzymy stopień wzrostu. Wzrost na pożywce syntetycznej jest proporcjonalny do ilości danego witaminu.

Tabela I

Zapotrzebowanie niektórych szczepów bakterii mlekowych na witaminy

Nazwa szczepu	Biotyna	PGA	Niacyna	Kw. pantot.	Ryboflaw.	Tiamina	Pirydoks
L. casei	+	+	+	+	+	—	+
L. arabinosus	+	—	+	+	—	—	—
L. fermenti	+	0	+	+	—	+	0
Leuc. mesenteroides	+	—	+	+	—	—	—
Str. faecalis R	+	+	+	+	—	—	+
Str. lactis	+	—	+	+	—	+	—

+ = czynnik konieczny do wzrostu, — = czynnik niepotrzebny do wzrostu, 0 = nie zbadano.

Analiza taka rozpada się na 10 oddzielnych etapów: 1) hodowanie kultur zapasowych, 2) przygotowanie syntetycznej pożywki, 3) przygotowanie zawiesiny bakterii do szczepienia, 4) przygotowanie próbki do oznaczenia, 5) sporządzenie wzorca, 6) sterylizacja pożywki i próbek badanych, 7) szczepienie próbek, 8) inkubacja, 9) oznaczenie stopnia wzrostu bakterii, 10) obliczenie wyników.

Kultury zapasowe

Dla kultur zapasowych stosuje się agar słupkowy. Bakterie lepiej rozwijają się w głębi agaru niż tuż pod powierzchnią (Snell 1948). Optimum pH rozwoju bakterii mlekowych leży między 5,5 a 6,5. Ponieważ w czasie wzrostu produkują one dość znaczne ilości kwasu mlekowego i silnie zakwaszają środowisko (niektóre bakterie mlekowe zakwaszają pożywkę do pH 3,0), pożywka musi być dostatecznie zbuforowana, gdyż duże stężenie jonów wodorowych działa hamująco na dalszy wzrost bakterii. Skład pożywki zapasowej bywa różnorodny, musi on jednak odpowiadać wymogom rozwojowym danego szczepu. Najczęściej stosuje się wyciąg drożdżowy z dodatkiem glikozy i agaru w odpowiednich stosunkach. Uniwersalną pożywką dla bakterii mlekowych jest tzw. agar serwatkowy.

Komórki przenosi się jałowo za pomocą igły platynowej, inkubuje się do momentu otrzymania wyraźnego nalotu (24 – 36 godzin) i przechowuje się w lodówce w temp. około + 4°. Częstość przeszczepiania nie jest bez znaczenia. Okazało się, że odnawianie hodowli rzadziej niż raz na miesiąc powoduje wyradzanie się szczepu. Również przeszczepianie na taką samą pożywkę przez szereg miesięcy powoduje podobne objawy. Dlatego też co kilka miesięcy należy wzbogacać pożywkę przez dodanie peptonu bądź wy-

ciągu wątrobowego (Snell, 1948). Ustalone warunki hodowli kultur zapasowych muszą być ściśle zachowane dla zapewnienia dokładności późniejszej analizie (Barton-Wright 1946).

Pożywki syntetyczne

Przygotowanie pożywki syntetycznej jest jedną z najważniejszych czynności i ma największy wpływ na dokładność oznaczania. Przede wszystkim pożywka podstawowa, zawierając wszystkie składniki potrzebne dla optymalnego wzrostu danego szczepu, musi być zupełnie wolna od substancji, którą chcemy oznaczyć. Zbyt duża bądź zbyt mała ilość jakiegoś składnika powoduje albo ograniczony, albo nadmierny wzrost. Ilości poszczególnych składników należy tak dobrać, aby któryś ze składników nie został wyczerpany przed zakończeniem inkubacji.

Wszystkie składniki pożywki syntetycznej można podzielić na 5 grup:

1. Aminokwasy — dodawane w postaci hydrolizatu białka, najczęściej kazeinu. Ponieważ w czasie przygotowywania hydrolizatu niektóre aminokwasy zostają zniszczone (tryptofan), a inne nie wchodzą w skład danego białka (np. cystyna w kazeinie), należy je dostarczyć osobno. Niekiedy hydrolizat kazeinu można zastąpić peptonem.

2. Zasady purynowe i pirymidynowe. Wszystkie prawie bakterie mlekowe wymagają obecności adeniny i guaniny, niektóre oprócz tego — ksantyny oraz hypoksantyny. Z zasad pirymidynowych egzogenny jest uracyl.

3. Witaminy rozpuszczalne w wodzie. Różne szczepy bakterii mlekowych potrzebują różnych witaminów z grupy B i te właśnie witaminy, które są niezbędne dla rozwoju danego mikroorganizmu, mogą być oznaczane mikrobiologicznie (patrz tabl. I).

4. Sole mineralne. Ilości dodawanych soli są znikome, poza tymi, które w pożywce spełniają rolę buforu. Z najważniejszych kationów potrzebnych dla rozwoju bakterii mlekowych wymienimy: Na, Fe, Mg, NH_4, Mn, K. Dwa ostatnie kationy próbowano nawet oznaczać mikrobiologicznie. Powyższe kationy stosuje się w postaci siarczanów i chlorków.

5. Cukier. Najczęściej stosuje się glukozę, rzadziej laktobiozę lub ksylozę. Cukier zostaje utleniany do kwasu mlekowego, którego ilość jest najczęściej przyjmowana za miarę stopnia wzrostu bakterii.

Pożywkę przygotowuje się o podwójnym stężeniu składników, tak że po dodaniu próbki i dopełnieniu wodą do odpowiedniej objętości otrzymuje się pożądane stężenie końcowe. Następnie podnosi się pH pożywki trochę ponad wielkość optymalną ze względu na to, że w czasie sterylizacji środowisko ulega zakwaszeniu (por. tab. II).

pH pożywki doprowadza się do 6,8 — 7,0 stosując stężony ług sodowy i kontrolując odczyn za pomocą papierka błękitu bromotymolowego. Lepsze wyniki daje potencjometryczne oznaczanie pH przy użyciu elektrody szklanej. Cukier dodaje się już po doprowadzeniu pH pożywki do odpowiedniego poziomu, ponieważ stężony ług powoduje karmelizację cukru. Pożywkę syntetyczną powinno się przygotowywać z zachowaniem bezwzględnej czystości tak w sensie chemicznym, jak i mikrobiologicznym, gdyż nawet drobne zanieczyszczenia innymi substancjami, np. ciałami tłuszczowymi powodują fałszywe wyniki analizy (Bauernfeind et al., 1942).

Tabela II

Skład pożywki syntetycznej dla oznaczenia ryboflawiny, kwasu nikotynowego i biotyny (Roberts i Snell, 1946)

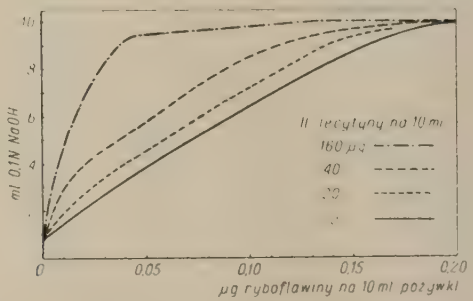
Składniki	Ilość na 10 ml pożywki
kazein (trawiony trzustką)	200 mg
cystyna	1 „
adenina	200 μg
guanina	100 „
uracyl	100 „
kwas p-aminobenzoesowy	1 „
biotyna	0,04 „
pantotenian wapnia	5 „
kwas pteroiloglutaminowy	0,02 „
kwas nikotynowy	5 „
pirydoksyna	10 „
ryboflawina	5 „
tiamina	5 „
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	8 mg
NaCl	0,4 „
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,4 „
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	1,6 „
KH_2PO_4	25 „
K_2HPO_4	25 „
octan sodu	200 „
glukoza	200 „

Przygotowanie zawiesiny drobnoustrojów

Dzień przed nastawieniem oznaczenia przeszczepia się bakterie z agaru na podstawową pożywkę płynną z dodatkiem takiej ilości odpowiedniego witaminu, aby zapewnić pełny wzrost bakteriom. Dodana ilość witaminu nie powinna przekraczać 0,5 μg, aby od nadmiaru tego witaminu można się było łatwo uwolnić przy sporządzaniu zawiesiny. W naszym Zakładzie stosuje się do tego celu zamiast pożywki syntetycznej, która jest kosztowna, jednoprocentowy ekstrakt drożdżowy z dodatkiem 0,5% glukozy i niektórych soli mineralnych. Pożywka taka jest odpowiednia dla wszystkich szczepów bakterii mlekowych, jest łatwa w przygotowaniu i daje dobre rezultaty. Po przeniesieniu komórek z agaru na pożywkę płynną inkubuje się hodowlę przez 16 — 18 godzin. Pod koniec tego okresu bakterie znajdują się w tzw. logarytmicznej fazie wzrostu, kiedy zdolność rozwojowa komórek jest największa. Następnie odwirowuje się komórki, przemywa kilkakrotnie jałowym roztworem soli fizjologicznej w celu usunięcia śladów pożywki, odpowiednio rozcieńcza i otrzymaną zawiesinę używa się do szczepienia próbek badanych.

Przygotowanie próbek badanych

Prawie wszystkie witaminy rozpuszczalne w wodzie nie występują w przyrodzie w stanie wolnym, ale w połączeniach, które w większości przypadków nie mogą być wykorzystywane przez mikroorganizmy (patrz tab. III). Tak np. tiamina występuje w postaci estru dwufosforowego lub w koenzymie karboksylazy α-ketokwasów; ryboflawina występuje w postaci estru fosforowego lub jako nukleotyd flawinowy, biorący udział w oddychaniu tkankowym; niacyna występuje w kompleksie kodehydrogenazy I i II, kwas pteroiloglutaminowy występuje w postaci kwasu tetra- i hepta-pteroiloglutaminowego itd. Niezbędnym przeto zabiegiem przed oznaczeniem danego witaminu jest jego uwolnienie z połączenia i otrzymanie w stanie przyswajalnym przez drobnoustroje. Witaminy odporne na czynniki hydrolizujące, jak ryboflawina, niacyna i biotyna, można ekstrahować z materiału badanego przez ogrzewanie pod ciśnieniem z silnymi kwasami mineralny-



Rys. 1 Wpływ lecytyny na oznaczanie ryboflawiny przy użyciu *L. casei* (wg Bauernfeinda)

mi. Inne, jak tiamina, kwas pantotenowy i PGA, uwalnia się przy pomocy hydrolizy enzymatycznej. Do tego celu używa się różnych enzymów z grupy peptydaz i fosfataz, jak papaina, koniugaza, klaraza, fosfataza (patrz tab. IV). Niektóre witaminy są dość wrażliwe na różne czynniki fizyczne. Np. ryboflawina i pirydoksyna na świetle, zwłaszcza w środowisku zasadowym, ulegają zamianie na formy nieczynne. Z tego względu witaminy te należy chronić przed dostępem światła, a ekstrakcję i odmierzanie wykonywać przy świetle czerwonym.

Bardzo często witaminom w produktach naturalnych towarzyszą ciała tłuszczowe, których obecność powoduje poważne błędy w oznaczaniu (Bauernfeind et al., 1942). Oprócz ciał tłuszczowych, zależnie od szczepu i oznaczanego witaminu, podobny wpływ wywiera skrobia, pewne zasady pirymidynowe (tymina) oraz aminokwasy, jak metionina i d-alanina (rys. 1 i 2). W czasie przygotowywania próbki należy zatem równocześnie usunąć te ciała przez odpowiednie zabiegi, jak sączenie przy odpowiednim

Tablica III

Wykaz witaminów, ich połączeń i szczepów bakterii używanych do analizy

Nazwa witaminu	Występ. w połącz.	Enzym	Substancje interferujące	Szczep bakterii	Czułość szczepu γ/ml pożywki
Tiamina	ester kwasu pyrofosforowego	karboksylaza ketokwasów	kokarboksylaza	*Lactobacillus fermenti Phycomyces blakesleanus*	0,005-0,1
Ryboflawina	ester kwasu ortofosforowego i kwas adenilowy	żółty enzym Warburga, oksydaza d-aminokwasów, oksydaza ksantynowa, diaforaza, dehydraza aldehydów	kwasy tłuszczowe, skrobia	*Lactobacillus casei*	0,03-0,5
Kwas nikotynowy	kodehydraza I i II, koramina, kwas nikotynurowy	różne dehydrogenazy o różnej specyfice	tryptofan, kwas antranilowy	*Lactobacillus arabinosus*	0,02-0,5
Biotyna	kompleks z awidyną	karboksylaza kwasu pyrogronowego	destiobiotyna, kwas olejowy i linolenowy, kw. pimelinowy	*Lactobacillus arabinosus*	0,00002-0,001
Pirydoksyna	ester fosforowy	dekarboksylaza l-aminokwasów, transaminazy	alanina (w dużych ilościach)	*Streptococcus faecalis R*	1,0-50,0
Pirydoksal	ester z kwasem fosforowym	dekarboksylazy l-aminokwasów, transaminazy	d-alanina	*Lactobacillus casei*	0,012-0,04
Pirydoksamina	fosforan pirydoksaminy	transaminazy kwasu glutaminowego i asparagin.	d-alanina	*Streptococcus faecalis R*	0,001-0,004
Kwas pantotenowy	koenzym A (ester fosforowy)	enzymy katalizujące acetylację i koniugacje	kwasy tłuszczowe, l-alanina	*Lactobacillus arabinosus*	0,005-0,2
Kwas pteroiloglutaminowy	kwasy foliowe	enzymy utleniające tyrozynę w wątrobie i syntet. kwasy nukleinowe	konjugaty kwasu foliowego, tymina, kw. desoksyrybonukleinowy, kw. pteroinowy	*Lactobacillus casei*	0,0005-0,015
Kwas p-aminobenzoesowy	w postaci peptydów z kw. p-aminobenzoilonoliglutamylglutaminowym	enzymy biorące udział w metabolizmie bakterii	metionina, puryny	*Lactobacillus arabinosus*	0,0001-0,0005
Inozytol	lipozytol, fosfatydy, połącz. z białkami, fityna	niektóre amylazy (trzustkowe)	niektóre stereoizomery inozytolu	*Saccharomyces carlsbergensis*	0,01-1,0
Witamin B_{12}	w postaci połącz. z białkami	enzymy syntetyz. białka, kataliz. transmetylacje	pochodne kobalaminy, substancje redukujące	*L. leichmanii, L. lactis Dorner Euglena gracilis*	0,00025–0,00075 10^{-12}-10^{-15} g
Kwas folinowy *citrivorum factor*		jak przy PGA	kwas formylofoliowy, rhizopteryna	*Leuconostoc citrovorus*	0,0001-0,001

Tablica IV

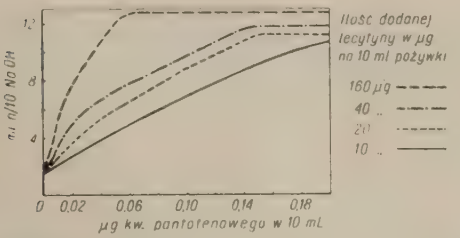
Sposób przygotowania próbek witaminów do oznaczenia mikrobiologicznego

Witamin	Sposób przygotowania próbki
Tiamina	Zrobić zawiesinę próbki w 15-krotnej obj. 0,1 N H_2SO_4 i ogrzewać na łaźni wodnej przez 30 minut. Doprowadzić pH do 1,5. Po oziębieniu dodać roztworu octanu sodu do pH 4,5. Na każde 10 mikrogramów spodziewanej tiaminy dać 1 ml 10-%-wego roztworu takadiastazy, klarazy, mylazy P lub innego podobnego enzymu. Mieszaninę inkubować w temp. 45 — 50° przez 3 godz., odwirować, rozcieńczyć i brać do badania (U. S. P. XII Suppl. 1953)
Ryboflawina	Ok. 1 g substancji badanej zadać 50 ml 0,1 N HCl. Wstawić do autoklawu pod ciśnieniem 1 atm. na 30 min. Po oziębieniu pH mieszaniny doprowadzić do 4,5 za pomocą NaOH. Przesączyć, doprowadzić do pH 6,8 i ekstrahować dwukrotnie eterem (Wegner et al., 1942)
Kwas nikotynowy	Ok. 1 g substancji badanej zadać 50 ml 1 N HCl. Autoklawować przez 1 godz. w temp. 120°. Po oziębieniu, pH zawartości doprowadzić do 4,5 za pomocą 10 N NaOH, odsączyć i doprowadzić pH do 6,8 (Krehl et al., 1946)
Biotyna	Materiał badany zadać 10-krotną obj. 6 N H_2SO_4, umieścić w autoklawie w temp. 121° na okres 1 godz., kwas siarkowy wytrącić za pomocą nasyc. roztworu $Ba(OH)_2$. Odwirować siarczan baru, osad przemyć dwukrotnie wodą i popłuczyny dołączyć do przesączu (Johnson, 1948)
Kwas pantotenowy	Hydrolizę połączeń kwasu pantotenowego przeprowadza się według następującego schematu:

Odczynniki	Próba ślepa	Próba kontrolna	Próba pełna
roztwór materiału badanego	—	1 ml	1 ml
roztwór enzymu wątrob. w 0,02 M $NaHCO_3$	0,05 ml	—	0,05 ml
roztwór alkalicznej fosfatazy	0,2 ml	—	0,2 ml
0,1 M $NaHCO_3$	0,05 ml	—	0,05 ml
woda	1,7 ml	1 ml	0,7 ml

Inkubować w temp. 37° przez 4 godz., zawartość probówek odwirować, przesączyć, rozcieńczyć i brać do badania (Neilands i Strong, 1948, Schmidt i Thannhauser, 1943)

Kwas pteroiloglutaminowy	Do ok. 0,5 ml próbki badanej dodać 5 ml buforu octanowego o pH 4,5, dodać 0,3 g sproszkowanej konjugazy z nerki świńskiej. Zawartość dopełnić wodą do 10 ml, dać 2 krople toluenu i inkubować w temp. 37° przez 48 godz. Mieszaninę parować w 100° przez 5 minut, doprowadzić pH do 6,8, przesączyć przez gęsty sączek, rozcieńczyć (Bird et al., 1945)
Pirydoksyna pidydoksal pirydoksamina	Z małej ilości próbki badanej zrobić zawiesinę w 0,055 N HCl. Mieszaninę autoklawować pod ciśn. 1,4 atm. w ciągu 5 godz., oziębić, doprowadzić pH do 6,8 (Rabinowitz i Snell, 1947)
Kwas p-aminobenzoesowy	Ok. 1 g próbki dobrze utartej dać do 5 ml 6 N H_2SO_4. Autoklawować przez 1 godz. pod ciśn. 1 atm., kwas siarkowy zobojętnić $Ba(OH)_2$, odwirować i wyekstrahować osad siarczanu baru, doprowadzić do pH 6,8, rozcieńczyć (Oheldelin i Bennet, 1945)
Inozytol	Próbkę ogrzewać pod chłodnicą zwrotną z 18-% HCl przez 6 godz. Kwas solny oddestylować w próżni. Osad rozpuścić w wodzie i doprowadzić pH do ok. 5 (Hopkins i Pennigton, 1947)
Witamin B_{12}	Materiał badany zhomogenizować, zadać 0,8% $NaHCO_3$, dodać roztworu trypsyny i inkubować przez 24 do 30 godzin w temp. 37°, dodać buforu fosforanowego o pH 6,8, trzymać pod toluenem (Thompson i Dietrich, 1950). Dla oznaczenia wit. B_{12} za pomocą *Euglena gracillis* badany materiał autoklawować w 100° przez 30 do 60 min., rozcieńczyć.
Kwas folinowy	1 g tkanki badanej zhomogenizować w 50 ml wody, dodać 30 mg suchej erepsyny i roztwór doprowadzić do pH 7. Dać kilka kropli toluenu i inkubować w temp. 37° przez 48 godz. Po inkubacji sprawdzić pH, rozcieńczyć. (Scheid i Schweigert, 1950).

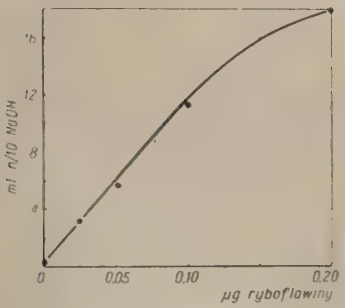


Rys. 2. Wpływ lecytyny na oznaczanie kwasu pantotenowego (wg Bauernfeinda)

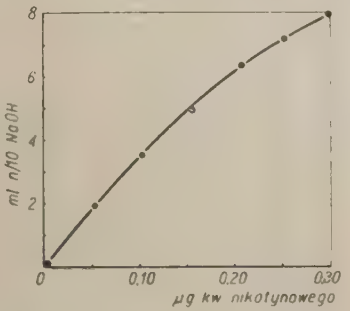
pH lub ekstrakcję eterem itp. Wyższe kwasy tłuszczowe można oddzielić prawie zupełnie przez sączenie zhydrolizowanej próbki przy pH 4,5. Po przeprowadzeniu hydrolizy i oczyszczeniu próbkę rozcieńcza się odpowiednio (stosownie do zakresu krzywej wzorcowej) i dodaje do pożywki syntetycznej.

Przygotowanie wzorca

Zasadniczą czynnością jest wykreślenie krzywej, przy czym na osi odciętych znaczymy wzrastające stężenia danego witaminu użytego w stanie czystym, na osi rzędnych zaś znaczymy stopień wzrostu bakterii. W tym celu



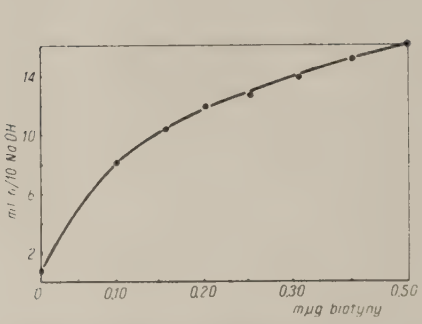
Rys. 3. Krzywa wzorcowa dla ryboflawiny, szczep *L. casei*, pożywka p. tablica II



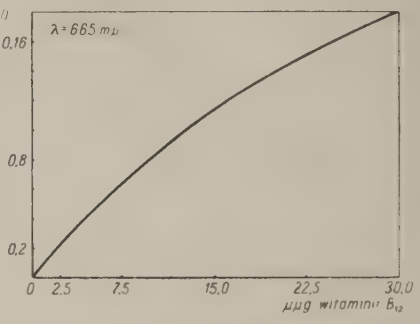
Rys. 4. Krzywa wzorcowa dla kwasu nikotynowego, szczep *L. arabinosus*, pożywka p. tablica II

pożywkę syntetyczną rozlewa się do probówek, a następnie dodaje roztwór witaminu w odpowiednim stężeniu. Wszystkie probówki uzupełnia się wodą do jednakowej objętości, zamyka korkami z waty lub kapturkami aluminiowymi i wyjaławia. Po zaszczepieniu probówek przygotowaną uprzednio zawiesiną bakterii i po inkubacji oznacza się stopień wzrostu. Uzyskane wartości przenosi się na wykres i sporządza krzywą standartową.

Wszystkie, otrzymane później przy oznaczaniu, wartości dla materiału badanego odczytuje się za pomocą tak sporządzonego wykresu. Zakres stę-



Rys. 5. Krzywa wzorcowa dla biotyny, szczep *L. arabinosus*, pożywka p. tablica II



Rys. 6. Krzywa wzorcowa dla witaminu B_{12}, szczep *Euglena gracilis*, chlorofil ekstrahowano metanolem i ekstynkcję oznaczano za pomocą spektrofotometru fotoelektrycznego (Ostrowski i Żak, 1953)

żeń wzorca zależy od szczepu użytego do analizy i od rodzaju badanego witaminu. Np. dla biotyny przy użyciu *L. arabinosus* zakres standartu leży między 0,1 a 0,5 mμg, dla ryboflawiny między 0,01 — 0,3 μg (por. rys. 3, 4, 5, 6).

Wyjaławianie pożywki

Najczęściej stosowaną metodą wyjaławiania w analizie mikrobiologicznej jest autoklawowanie pod zwiększonym ciśnieniem. Stosuje się również tzw. chłodną sterylizację, którą przeprowadza się za pomocą odpowiednich sączków (Asatiani, 1952). W literaturze zagranicznej jako optymalne warunki wyjaławiania podawane jest ciśnienie 1 atm (121°) przez 15 minut. W naszym Zakładzie zauważono, że powyższy czas wyjaławiania jest zbyt długi, ponieważ występuje w dość znacznym stopniu karmelizacja i huminizacja pożywki. Od kilku lat stosujemy ciśnienie 0,7 atm. w ciągu 10 minut i dotychczas nie zanotowano ani jednego przypadku zakażenia, a zabarwienie pożywki zmienia się w stopniu minimalnym. Stopień karmelizacji pożywki ma bardzo wybitny wpływ na dokładność oznaczenia Stwierdza się nie tylko zmniejszenie pojemności buforowej pożywki, ale również zahamowanie wzrostu bakterii, spowodowane prawdopodobnie obecnością ciał huminowych. Szczególnie wrażliwy na tego rodzaju produkty jest szczep *L. casei*. Substancje huminowe powstają zawsze, jeśli ogrzewa się cukier w obecności aminokwasów i fosforanów przy pH bliskim 7 (Mc Inroy et al., 1949). Większą rolę odgrywa czas ogrzewania niż wysokość temperatury, gdyż obserwuje się większy stopień zbrunatnienia przy przedłużonym czasie autoklawowania a niższym ciśnieniu niż odwrotnie.

Nadmienić należy, że niektóre bakterie mlekowe (*Streptococcus faecalis*) zupełnie się nie rozwijają na pożywce nie autoklawowanej. Przyczyna tego

zjawiska nie jest jeszcze wyjaśniona (Niven i Sherman, 1944). Prawdopodobnie chodzi tu o powstawanie substancji redukujących, które można zastąpić cysteiną lub tioglikolanem. W niektórych wypadkach dodanie cysteiny, tioglikolanu bądź pyrogronianu do nie sterylizowanej pożywki rzeczywiście powoduje stymulację wzrostu (Rabinowitz i Snell, 1947).

W czasie wyjaławiania mogą w pożywce zachodzić różne procesy chemiczne, prowadzące do rozpadu ważnych dla wzrostu bakterii aminokwasów czy witaminów, a na to miejsce powstać mogą inne związki, hamujące wzrost lub powodujące zafałszowanie wyników. Tak np. z pirydoksyny powstać może pirydoksal, z pirydoksalu pirydoksamina wskutek procesu transaminacji, tiamina może się rozpaść na komponenty tiazolową i pirymidynową itp. (Hendlin i Soars, 1951).

Szczepienie i inkubacja próbek badanych

Przygotowaną uprzednio zawiesinę bakteryjną dodaje się po 1 kropli do poszczególnych probówek za pomocą sterylnej pipety. W naszym Zakładzie zastosowano wygodniejszy i szybszy sposób szczepienia przez użycie strzykawki lekarskiej z długą igłą. Strzykawkę uprzednio wysterylizowaną umieszcza się w statywie pod odpowiednim kątem, nabiera zawiesinę i przez pchnięcie tłoczka wpuszcza jedną kroplę do probówki testowej.

Ponieważ uwolnienie zawiesiny od śladów badanego witaminu jest praktycznie niemożliwe, przeto ilość dodanej zawiesiny ma duży wpływ na fluktuację wzrostu w poszczególnych probówkach (Shull i Peterson, 1943). Do probówek należy wprowadzać jednakowe objętości zawiesiny, zawierające w przybliżeniu jednakowe ilości komórek. Niektórzy autorowie stosują inny sposób szczepienia. Po wyjałowieniu pożywki w osobnej kolbie dodają pewną ilość zawiesiny komórek i następnie rozdzielają już zaszczepioną pożywkę do probówek (Hertz, 1943). W końcu dodają jałowy roztwór próbki badanej i dopełniają ilość wodą. Ten sposób wymaga jednak więcej zabiegów technicznych i zwiększa niebezpieczeństwo zakażenia.

Inkubację przeprowadza się w temperaturze optymalnej dla danego szczepu przez czas zależny od metody oznaczania stopnia wzrostu. Optymalna temperatura dla bakterii mlekowych waha się w granicach od 30 do 37° zależnie od szczepu. Wahania temperatury w termostacie mają bardzo duży wpływ na rozbieżność wyników przy jednakowych stężeniach próbki badanej. Różni autorzy stwierdzają (Bolton, 1949), co również zaobserwowano w naszym Zakładzie, że jeśli wahania temperatury w termostacie wynoszą ±2°, w probówkach o tych samych stężeniach witaminów stwierdza się różne ilości wytworzonego kwasu mlekowego. Wahania te sięgać mogą od 10 do 20%.

W celu skontrolowania tych obserwacji inkubowano równocześnie takie same ilości probówek z jednakowym stężeniem niacyny w ciągu tego samego czasu w dwu termostatach. Jeden zwykły termostat powietrzny, którego wahania temperatury wynosiły ok. 2°, drugi — ultratermostat wodny z wahaniami ±0,01°. Po oznaczeniu ilości kwasu mlekowego w obu partiach

probówek okazało się, że różnice między probówkami inkubowanymi w ultratermostacie nie przekraczały 0,5%. Po wyciągnięciu średniej ze wszystkich miareczkowań pierwszego przypadku i odczytaniu wartości dodanego witaminu znaleziono tylko 90% ilości początkowej. W drugim przypadku znaleziona wartość wynosiła 98,5% dodanego stężenia niacyny. Z powyższego widać, że temperatura ma wybitny wpływ na dokładność oznaczenia. Wahania temperatury termostatu powinny być zatem ograniczone do minimum.

Czas inkubacji zależy od metody oznaczania stopnia wzrostu. Przy zastosowaniu metody nefelometrycznej okres inkubacji wynosi od 18 do 48 godzin. Przy metodach miareczkowych czas inkubacji potrzebny do wyprodukowania maksymalnej ilości kwasu mlekowego wynosi od 72 do 96 godzin. Dłuższy czas inkubacji pozwala jednocześnie na eliminację wpływu czynników stymulujących wzrost, a nie będących witaminami. Substancje te wpływają na szybkość wzrostu w pierwszych fazach rozwoju mikroorganizmów, a w miarę czasu trwania inkubacji aktywność ich słabnie i różnice się wyrównują (Bauernfeind et al, 1942).

Oznaczanie stopnia wzrostu

Przy końcu okresu inkubacji mierzy się stopień wzrostu zależny od stężenia badanego witaminu w próbce. Stosowane są różne metody mniej lub bardziej zawiłe i wszystkie dają zbliżone wyniki. Często stosuje się po prostu ważenie suchych komórek bakteryjnych, odsączonych z pożywki (Schöpfer, 1945). Używa się również pomiaru zmętnienia pożywki za pomocą nefelometru (Rabinowitz i Snell, 1947), potencjometrycznego oznaczania pH (Silber i Mushett, 1942), chemicznego oznaczania ilości wytworzonego kwasu mlekowego, oznaczania azotu bakteryjnego i inne.

Najczęściej stosuje się metodę miareczkową za pomocą mianowanego roztworu zasady odmiareczkowując kwas mlekowy. Do miareczkowania używa się wskaźnika, którego punkt przejścia leży blisko pH 7. Ponieważ pożywka jest dość silnie zbuforowana oraz ze względu na szeroki zakres zmiany barwy wskaźnika w buforze, miareczkowanie wobec jakiegokolwiek wskaźnika chemicznego jest bardzo trudne. W naszym Zakładzie zastosowano z tego względu miareczkowanie potencjometryczne, stosując elektrodę chinhydrynową bądź szklaną. Sposób ten jest wygodny i dokładny.

Ponieważ na jedną próbkę witaminu daje się conajmniej 3 jednakowe stężenia z uzyskanych przy miareczkowaniu wartości należy wyciągnąć średnią arytmetyczną. Wartości różniące się między sobą więcej niż o 10% należy odrzucić. Otrzymany wynik przenosi się na wykres, gdzie odczytuje się ilość poszukiwanego witaminu. Jeśli wartość uzyskana w miareczkowaniu nie mieści się w zakresie standardu, oznaczenie należy powtórzyć uwzględniając odpowiednie rozcieńczenie próbki. Interpolacja, w tym wypadku dostosowywanie standardu do wyniku uzyskanego z miareczkowania, daje wyniki fałszywe, ponieważ wzrost bakterii jest tylko na pewnym odcinku krzywej proporcjonalny do stężenia czynnika, na początku zaś i na końcu otrzymuje się wyniki niedokładne.

Wspomniano już wyżej, że szereg substancji nie będących witaminami często powoduje stymulację wzrostu danego szczepu, niejednokrotnie w wyższym stopniu niż sam witamin. Dlatego przygotowanie próbki do oznaczenia, pozbawienie jej związków interferujących z oznaczanym witaminem ma decydujący wpływ na dokładność oznaczenia.

Prawie wszystkie zasadnicze błędy metod mikrobiologicznych daje się wyeliminować, jeśli się zwróci uwagę na następujące fakty: 1) wzrost bakterii mlekowych powodować mogą substancje nie mające charakteru witaminowego, kiedy dany witamin znajduje się w pożywce w ilości suboptymalnej, 2) niektóre substancje mogą wchodzić w miejsce witaminu w tok reakcji przemiany materii bakterii, dając zupełnie różną krzywą wzrostu, 3) niektóre substancje fizjologicznie związane z danym witaminem (np. kwas foliowy w obecności tyminy) wchodzą w reakcję w miejsce witaminu dając tym samym różne zaburzenia wzrostu.

Specyficzność metod mikrobiologicznych jest bardzo duża, chociaż niektóre mikroorganizmy nie rozróżniają w wielu przypadkach tzw. analogonów strukturalnych. *L. casei* jest niewrażliwy na kwas tetra-pteroiloglutaminowy, a zużytkowuje mono-pteroiloglutaminowy, *Acetobacter suboxydans* nie rośnie w obecności kwasu pantotenowego, rozwija się natomiast po dodaniu kwasu pantoinowego, niektóre mikroorganizmy zużytkowują kwas nikotynowy, zaś amid tego kwasu jest dla nich nieczynny. Jedne bakterie zużytkowują tiaminę, inne tylko jej komponentę tiazolową, a jeszcze inne tylko pirymidynową itd.

W ostatnim czasie Winsten i Eigen (1950) opisali nową metodę oznaczania witaminu B_{12}, która jest połączeniem metody mikrobiologicznej i chromatografii bibułowej, nazwaną przez autorów bioautografią. Roztwór, który zawiera badany czynnik, rozdziela się za pomocą chromatografii i po rozdzieleniu bibułę nakłada się na powierzchnię pożywki agarowej, pozbawionej witaminu. Po zaszczepieniu odpowiednim szczepem po pewnym czasie inkubacji obserwuje się stopień wzrostu mikroorganizmów w miejscu odpowiadającym umiejscowieniu witaminu. Metoda ta może mieć również zastosowanie do analizy ilościowej.

Stosując różne pożywki i różne szczepy bakterii można za pomocą tej metody różnicować i oznaczać liczne czynniki wzrostowe.

Metody mikrobiologiczne stosuje się również do oznaczania witaminów rozpuszczalnych w tłuszczach (Konikowa i Kricman, 1951).

LITERATURA

1. Asatiani W. S., 1952: Mikrobiologiczeskije metody w biochimiczeskich issledowanjach, *Usp. Sowr. Biol.*, **33**:365.
2. Barton-Wright E. C., 1946: Practical methods for the microbiological assay of the vitamin B complex and essential amino acids, Ashe Laboratories, LTD.
3. Bauernfeind J. C., Sotier A. L. a. Boruf C. S., 1942: Growth stimulants in the microbiological assay for riboflavin and pantothenic acid, *Ind. Eng Chem., Anal.*, **14**:666.
4. Bolton W., 1949: A constant temperature bath for microbiological assay, *Analyst*, **74**:647.

5. Dunn M. S. et al, 1947: The amino acid requirements of twenty three lactic acid bacteria, *J. Biol. Chem.*, **168**:1.
6. Hendlin D. a. Soars M., 1951: *J. Biol. Chem.*, **188**:603.
7. Hertz R., 1943; *Proc. Exper. Biol. Med.*, **52**:15.
8. Hopkins R. H. a. Pennington R. J., 1947: The assay of the vitamin B_6 complex, *Biochem. J.*, **41**:110.
9. Konikowa A. S. i Kricman M. G., 1951: Primienienje mietoda mieczenych atomow w mikrobiologii, *Mikrobiologja*, **21**:58.
10. Koniuszy F. R. et al., 1948: *Science*, **107**:396.
11. Krehl W. A. et al., 1946: The distribution of niacinamide and niacin in natural materials, *J. Biol. Chem.*, **166**:53.
12. Lowry O. H. a. Bessey O. A., 1944: A method for the determination of five-tenth to two milimicrograms of riboflavin, *J. Biol. Chem.* **155**:71.
13. Mc Inroy E. E. et al., 1949: The effect of autoclaving with dextrose on the nutritive value of casein, *Arch. Biochem.* **20**:256.
14. Neilands J. B. a. Strong F. M., 1948: The enzymatic liberation of pantothenic acid, *Arch. Biochem.*, **19**:287.
15. Nencki M., 1881: cytat za Astiani, 1952, Mikrobiologiczeskije mietody w biochimiczeskich issledowanjach, *Usp. Sowr. Biol.*, **33**:365.
16. Niven C. F. a. Sherman J. M., 1944: Nutrition of the enterococci, *J. Bacteriol.*, **47**:335.
17. Omeliański W. L., 1924: Mikroorganizmy kak chimiczeskije rieaktiwy, NHTJ., L.
18. Rabinowitz J. C. a. Snell E. E., 1947: *Anal. Chem.*, **19**:277.
19. Roberts E. C. a. Snell E. E., 1946: An improved medium for microbiological assays with *Lactobacillus casei, J. Biol. Chem.* **163**:499.
20. Rogosa M., 1944: Microbiological method for the quantitative determination of small quantities of potassium, *J. Biol. Chem.*, **154**:307.
21. Scheid H. E. a. Schweigert B. S., 1950: Some factors affecting the potencies of vitamin B_{12} and *L. citrivorum* factor of certain natural products, *J. Biol. Chem.*, **185**:1.
22. Schmidt G. a. Thannhauser S. J., 1943: Intestinal phosphatase, *J. Biol. Chem.*, **149**:369.
23. Schopfer W. H., 1945: Les tests microbiologiques pour la détermination des vitamines, *Experientia*, **1**:183.
24. Shull G. M. a. Peterson W. H., 1943: Improvements in the *Lactobacillus casei* assay for biotin, *J. Biol. Chem.*, **151**:201.
25. Silber R. H. a. Mushett Ch. W., 1942: pH change as a medsure of growth of *Lactobacillus casei* in vitamin assays, *J. Biol. Chem.*, **146**:271.
26. Snell E. E., 1948: Use of microorganisms for assay of vitamins, *Physiol. Rev.*, **28**:255.
27. Snell E. E., a. Strong F. M., 1939: *Ind. Eng. Chem. Anal.*, **11**:346.
28. Thompson H. T. et al., 1950: The use of *Lactobacillus leichmanii* in the estimation of vitamin B_{12} activity, *J. Biol. Chem.*, **184**:175.
29. Wegner M. J. et al., 1942: Influence of the method of preparation of sample on microbiological assay for riboflavin, *J. Biol. Chem.*, **146**:547.
30. Winogradski S. N., 1897: O roli mikrobow w krugoworotie żizni.
31. Winsten W. A. a. Eigen E., 1950: Bioautographic studies with use of *Leuconostoc citrovorum* 8081, *J. Biol. Chem.*, **184**:155.

A. Szember

ZARYS ROZWOJU BADAŃ MIKROBIOLOGICZNYCH NAD KISZONKAMI PASZOWYMI

ОЧЕРКИ ПО РАЗВИТИЮ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НАД СИЛОСАМИ

THE REVIEW OF MICROBIOLOGICAL STUDIES ON THE FODDER SILAGES

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej UMCS w Lublinie
Wpłynęło dnia 20.V.1953 r.

Kiszonki jako forma konserwowania produktów spożywczych znane były od stuleci. Jak podaje Löhnis (1935), już starożytni Grecy i Rzymianie znali kiszonki i sporządzali dla nich odpowiednie zbiorniki. Według Zubrilina (1947) kiszonki były znane nie tylko ludom śródziemnomorskim, lecz także narodom Azji i północnym Słowianom.

Znaczenie kiszonek nabiera szczególnej doniosłości w krajach północnych o rozwiniętej hodowli zwierząt, a o krótkim okresie wegetacji roślin. Jak pisze Virtanen (1947): „Tylko nieznaczna część świata zaopatruje swoje zwierzęta przez cały rok w świeżą paszę pastwiskową; reszta zmuszona jest paszę magazynować". W krajach północnych odczuwa się brak świeżej paszy już w drugiej połowie lata, co wpływa ujemnie na produkcję mleka. Rozporządzanie w tym okresie rezerwą paszową w postaci kiszonek ma duże znaczenie gospodarcze i jest cenną pomocą w żywieniu zwierząt (Zachariew, 1952). Porównując kaloryczność różnych pasz stwierdzono, że kiszonki są pod tym względem bardzo cenne. Np. kiszonka z koniczyny zajmuje pierwsze miejsce pod względem kaloryczności, a siano z lucerny dopiero ósme na 11 rodzajów pasz badanych przez Christensena i Hoppera (1938). Doceniając dużą rolę kiszonek w żywieniu zwierząt, w fermach hodowlanych ZSRR dawki kiszonek dla krów mlecznych wahają się przez wiele miesięcy wg Emelianowa (1951) w granicach 38 — — 48% ogólnej racji żywnościowej. W Niemczech robiono próby karmienia kur-niosek kiszonkami ziemniaczanymi i nie zaobserwowano żadnych szkodliwych następstw w zdrowiu kur i w jakości znoszonych przez nie jaj (Liebscher, 1938). Jak wiadomo, obok kiszonek paszowych powszechnie przyrządzamy także kiszonki przeznaczone dla ludzi, takie jak kwaszona kapusta, ogórki itp. W niektórych krajach stosuje się również zakwaszanie produktów mięsnych, jak np. kiełbasy, za pomocą bakterii fermentacji mlekowej (Tittsler i współpracownicy, 1952).

Zakiszanie pasz przeprowadza się najczęściej w dołach ziemnych. Sposób ten znano od niepamiętnych czasów, budową zaś silosów nadziemnych zajęto się dopiero w latach trzydziestych ubiegłego stulecia (Löhnis, 1935). Obecnie używa się obok cementowanych dołów ziemnych także uszczelnionych wież budowanych na powierzchni ziemi. W celu przygotowania pasz do zakiszania używa się obecnie różnych maszyn i specjalnych urządzeń ułatwiających pracę robotników (Gałdin, 1951).

Najstarszym i najszerzej stosowanym sposobem konserwowania pasz jest, jak wiadomo, ich suszenie. Nie opłaca się to jednak z paszami zbyt bogatymi w wodę (Orla-Jensen S. i A. D. i Kjaer, 1947, Malarski i Szymański, 1933), gdyż susząc te pasze lub tylko przechowując je luźno ułożone w zbiorniku, narażamy je na wielkie straty suchej masy. Straty te wg Löhnisa (1935) mogą dochodzić nawet do 60% s. m. Ulvesli (1938) podaje np. straty przechowywanych w piwnicy ziemniaków na 16% suchej masy i 55% białka surowego. Wielkie są także straty witamin (A i C), gdyż mogą wynosić od 1,4 — 2,8% na godzinę w zależności od temperatury suszenia (Zubrilin, 1947). Natomiast według tego samego badacza w kiszonkach witaminy nie ulegają zniszczeniu.

Mimo że kiszonki znane są już od zamierzchłych czasów, opracowanie sposobów ich racjonalnego przyrządzania stało się możliwe dopiero w wyniku rozwoju mikrobiologii fermentacyjnej i biochemii.

Metody zakiszania pasz

Otrzymanie dobrych kiszonek zależy od wielu czynników. Czynnikami tymi są: gatunek roślin użytych jako materiał wyjściowy, warunki uprawy, czas zbioru i uzależniony od tego skład chemiczny roślin. Ważna jest przy tym procentowa zawartość wody w paszy. Na jakość kiszonki wpływa też technika jej wyrobu, m. in. stan rozdrobnienia surowca, sposób jego ubicia itp. Przekonano się, że wczesne wystąpienie soku w paszach wysokobiałkowych, do których dodano cukru, powoduje rozwój właściwych zespołów mikroorganizmów kwaszących. Należy przy tym zwrócić uwagę na to, że ilość wydobywającego się z tkanek soku nie jest proporcjonalna do ciśnienia panującego w kiszonce (Ruschmann i Bartram, 1940).

Jak podają Zubrilin, Miszustin i Harczenko (1950), pH silosowanych pasz kształtuje się różnie, w zależności od ich rozdrobnienia. Na przykład przy zakiszaniu różnie posiekanego owsa zmiany pH będą następujące:

owies rozdrobniony	5,47	4,34	4,20	3,94	3,87	pH
owies nie rozdrobniony	5,47	5,02	4,73	4,56	4,28	pH
	1	3	10	15	20	dni kiszenia

Pasze zawierające dużo węglowodanów łatwo fermentujących, a więc np. ziemniaki (Glaubitz, 1936, Ruschmann, 1938, Herzig, 1946) i topinambur (Brigl i Windheuser, 1932, Ruschmann, 1933) kiszą się wyśmienicie. Wprawdzie topinambur ma bardzo mało białka i nie może również służyć jako rezerwa witaminowa (Scheu-

nert, 1938), ale w mieszankach z innymi roślinami daje cenne kiszonki, łakomie zjadane przez zwierzęta (Dijkstra, 1939). Ziemniaki przed kiszeniem bywają najczęściej parowane. Jak wykazali Etchells i Jones (1949), w dobrze uparowanych ziemniakach zostają zniszczone całkowicie bakterie właściwej fermentacji mlekowej. Jednak kiszonki takie mogą być mimo to dobre, gdyż proces zakiszania prowadzą w nich termofilne, przetrwalnikujące laseczki.

Od niedawna próbuje się wzbogacać pasze węglowodanowe, np. ziemniaki, w białko i witaminy przez dodanie roślin motylkowych (Herzig, 1946, Jankiewicz, 1948, Bieriezowski, 1951, b, Łysogorow, Sołtykow i Werbicz, 1951, Szember, 1952). Na ogół daje to dobre wyniki, gdyż przez dodanie świeżych części nadziemnych tych roślin do surowca skrobiowego powodujemy szybką hydrolizę skrobi na cukry proste przez działalność zawartych w nich enzymów (Bieriezowski, 1951 a).

Nie należy jednak przeceniać wartości kiszonek ziemniaczanych zakiszonych z roślinami motylkowymi, gdyż — jak to podają Kirsch i Jantzon (1940) — przy silosowaniu parowanych ziemniaków z dodatkiem roślin motylkowych w stosunku 7 : 3 następowało obniżenie strawności gotowej kiszonki o około 20%. Przy zakiszaniu parowanych ziemniaków z dodatkiem bobiku w stosunku 5 : 1 spadek ten był mniejszy i otrzymany produkt zachował około 90% strawności (strawność ziemniaków wynosi 95%). Produkty te, wg Kirscha, nie nadają się do intensywnego tuczenia świń. Natomiast kiszonki sporządzone z parowanych ziemniaków bez żadnych dodatków były trwałe i łakomie zjadane przez zwierzęta (Scharrer i Schreiber, 1941 a). Próbowano również wzbogacać kiszonki w azot dodając do nich amoniaku lub soli amonowych (Windheuser 1935, 1939). Próby te jednak wypadły niekorzystnie.

Rośliny bogate w białko z trudnością ulegają fermentacji mlekowej (Virtanen, 1947). Próbowano zaradzić temu przez dodanie do nich cukru w postaci melasy (Ruschmann i Bartram, 1943, Pette, 1947, Jarl, 1951 b) i szczepiąc silaż bakteriami kwasu mlekowego (Ruschmann, 1940, Zubrilin, 1947). Należy przy tym pamiętać, że dodając cukier w postaci melasy do paszy zasobnej w wodę musimy go dać znacznie więcej niż do paszy suchej, aby osiągnąć wymagane stężenie cukru („minimum cukrowe"). Przypominamy, że „minimum cukrowe" jest to ilość cukru w paszy silosowanej potrzebna do wytworzenia takiej ilości kwasów, aby osiągnąć pH 4,2.

Aby zabezpieczyć trudno ulegające fermentacji rośliny białkowe przed wadliwymi procesami mikrobiologicznymi, dodawano do nich uparowane i już zakiszone ziemniaki. Przekonano się, że przy dodaniu 5% takiego produktu można otrzymać bardzo dobre kiszonki nawet z lucerny (Gneist, 1940). Inne wyniki otrzymali Scharrer i Schreiber (1942), którzy dodawali 10% parowanych i już zakiszonych ziemniaków do lucerny. Otrzymane przez nich kiszonki zostały ocenione jako złe. Sporządzano również z rozgotowanych ziemniaków zawiesinę wodną (1 cz. ziemniaków na 0,7—1 cz. wody) i spryskiwano nią równomiernie materiał roślinny (Bieriezowski, 1951 b). Próby te dały wyniki pozytywne.

Według Virtanena (1947) białko roślin podczas ich zakiszania może się rozpadać na szereg aminokwasów, takich jak alanina, walina, leucyna, fenylalanina i inne, oraz związków pochodnych. Mogą też następować straty azotu, gdy rozpad ten pójdzie dalej, aż do amoniaku. Dlatego też badacz ten zaleca przed silosowaniem pasz ich zakwaszanie przez dodanie kwasów mineralnych (mieszanki HCl + H_2SO_4). Kwasów tych należy dać od razu taką ilość, by pH silosowanych roślin spadło poniżej 4,2. Przy pH 3,27 ustaje zupełnie oddychanie tkankowe, a także ulega ograniczeniu rozpad białek do amoniaku. Zakwaszając pasze kwasami mineralnymi uwalniamy kwasy organiczne z ich soli. Według Virtanena przy stosowaniu tej metody w gotowej kiszonce znajdują się w postaci wolnej tylko kwasy organiczne. Stosowanie kwasów mineralnych jest przez wielu rolników krytykowane z powodu szkodliwego wpływu na zdrowie robotników i ze względu na możliwość uszkodzenia ubrania. Stwierdzono też, że kiszonki w ten sposób przyrządzane powodują często kwasicę u bydła (Orla-Jensen i współpracownicy, 1947 a). Natomiast Zubrilin i współpracownicy (1950), opierając się na badaniach przeprowadzonych w ZSRR, jak również badacze niemieccy (Flieg, 1940, Wöhlbier i Siebert, 1940, Keil, 1941) podają, że pasze zakiszane sztucznie za pomocą kwasów mineralnych (zabiegowi temu poddaje się pasze ulegające samozakiszaniu z trudnością) nie działają szkodliwie na zdrowie zwierząt. Trzeba je tylko dawać bydłu w odpowiedniej ilości i dodawać kredy do racji dziennej. W niektórych krajach, stosując metodę „A. I. V" (metoda Virtanena) używa się kwasu fosforowego jako mniej żrącego od kwasów zalecanych przez Virtanena. Dodawanie do paszy kwasu fosforowego może być racjonalnym sposobem wzbogacenia w fosfor gleby, do której dostanie się on wraz z kałem zwierząt karmionych taką kiszonką. Próbowano też innych środków zaradczych, stosując preparaty znane pod nazwą „Alfasil" (roztwór kwasu mrówkowego), „Lesal" (preparat hamujący fermentację) itp. i dodając równocześnie pewne ilości cukru (Sauer, 1940).

Doświadczenia nad zakiszaniem roślin motylkowych przeprowadzał także Jarl (1951 b). Stosował on różne metody zakwaszania pasz zielonych bogatych w białko i porównywał otrzymane kiszonki z paszą zakwaszoną sztucznie kwasami mineralnymi według metody „A. I. V". Wszystkie kiszonki były oceniane za pomocą klucza Fliega na podstawie przeprowadzonych analiz chemicznych. Kiszonki tego badacza zakwaszane sztucznie kwasami mineralnymi miały zawsze ocenę dobrą lub bardzo dobrą.

Jarl stosował również dodatek serwatki wraz z kwasem mrówkowym, mieszając je dokładnie z zieloną masą silosowanych roślin. Na podstawie przeprowadzonych analiz chemicznych stwierdził on, że dodatek 15,4% serwatki zawierającej 0,2% kwasu mrówkowego daje kiszonki miernej jakości (otrzymały one 14 na 35 punktów). Zmniejszając dawki serwatki, ale zwiększając w niej ilości kwasu mrówkowego otrzymał lepsze wyniki, gdyż przy dodatku 4,5% serwatki zawierającej 8% kwasu mrówkowego uzyskana kiszonka otrzymała ocenę bardzo dobrą (35 punktów). Stosowany przez Jarla 3% dodatek melasy do świeżych pasz silosowanych dawał też dobre wyniki, gdyż uzyskana kiszonka była bardzo dobra (33 punkty). Badacz ten, porównując kiszonki z świeżych roślin motylkowych, przyrządzonych z dodatkiem 2% melasy, z kiszonkami tych roślin otrzymanymi przy do-

datku 5% śruty owsianej stwierdził, że obie kiszonki są dobre. Natomiast otrzymane przez Jarla kiszonki z samych tylko roślin motylkowych były zawsze miernej jakości.

Stosowano także różne inne sposoby ułatwiające prawidłowe zakiszanie, np. szczepionkę bakterii kwasu mlekowego (nazwa szczepionki: „G. F. S"), dodając ją do roślin motylkowych łącznie z 1,5% dodatkiem cukru i z 1,5% „Amasilu" (kwas mrówkowy). Próby te jednak nie udały się, gdyż uzyskane w ten sposób kiszonki miały pH 5,9 — 6,8. Zostały też ocenione jako na ogół bardzo złe (Scharrer i Schreiber, 1941 b i 1944).

Zakwaszanie pasz kwasem mrówkowym („Amasil") stosowano również w Niemczech. Sposób ten jednak skrytykował Ruschmann (1941 b) znajdując, że otrzymuje się kiszonki szkodliwe dla zdrowia zwierząt. Na krytykę tę odpowiedział Speer (1942), zalecając przyrządzanie kiszonek właśnie za pomocą kwasu mrówkowego.

Szukając różnych sposobów najlepszego zakonserwowania pasz zielonych propagowano pod koniec ubiegłego stulecia na Zachodzie szczególnie w Szwajcarii, tzw. „gorące silosowanie", w przeciwieństwie do „zimnego", przeprowadzanego w temperaturze nie wyższej niż 20° i dającego paszę zakwaszoną. „Gorące silosowanie" uzyskuje się przez luźne ułożenie w zbiorniku paszy, co powoduje jej zagrzanie się. Krzywa temperatur wykazywała w takim silażu dwa maksima: najpierw niższe, wynikające z procesów oddechowych samych roślin, i drugie wyższe, dosięgające często 70°, wywoływane działalnością mikroorganizmów termofilnych. Badania uczonych radzieckich w 1948 r. wykazały, że w warunkach podwyższonej temperatury w silażu (do 70°) następuje brązowienie paszy na skutek powstawania ciemno zabarwionych substancji — melanoidów. Substancje te powstają z połączeń aminokwasów z pentozami. Pasze w ten sposób przyrządzone mają zapach miodu. Na skutek hydrolizy łatwo strawnych białek następuje w takiej paszy znaczny spadek strawności (Zubrilin i współpracownicy, 1950). Sądzono, że tak przygotowana pasza, powszechnie nazywana „słodką", będzie bardzo cenna, szczególnie jako pasza dla krów. Przypuszczano mianowicie, że wysoka temperatura zahamuje rozwój laseczek fermentacji masłowej, w wyniku czego mleko nie będzie wadliwie zakażone i będzie cennym surowcem do wyrobu serów. Przy bliższym zbadaniu okazało się jednak, że właśnie ta pasza zawiera bardzo duże ilości *Clostridium* i że skarmianie jej obniża wartość mleka (Orla-Jensen i współpracownicy, 1947). Próbowano więc zabezpieczyć „słodką" paszę przed szkodliwym działaniem laseczek fermentacji masłowej szczepiąc ją termofilami przetrwalnikującymi, zbliżonymi do typu *Bac. subtilis* (Demeter, wg Orla-Jensena i współpracowników, 1947). Laseczki te mogą wytwarzać do 0,5% kwasu mlekowego, co zdaniem Jensena wywiera już pewien hamujący wpływ na rozwój *Clostridium*.

Straty suchej masy

Olbrzymie straty suchej masy, wynoszące często ponad 50%, jak również straty witamin (A i C) spowodowały zarzucenie „gorącej" metody konserwowania pasz (Löhnis, 1935).

Przy zakiszaniu pasz za pomocą tzw. „zimnej" metody powstają rów-

nież pewne straty, których wysokość uzależniona jest od wielu czynników zewnętrznych. Wg Kinga (Löhnis, 1935) w zakiszanej koniczynie takie straty suchej substancji w zależności od ilości zawartej w niej wody wynoszą:

ilość suchej masy w kiszonce	w %	32	30	22
straty suchej masy	w %	10	16	21

Jak widzimy, im bardziej wodnista jest pasza, tym większe są straty suchej masy. Wyniki te potwierdzają analogiczne badania Jarla (1951 a). Również wg innych badaczy w kiszonkach dojrzewających w optymalnych warunkach straty są dość duże. I tak straty suchej masy esparcety wynoszą 24% (Weiske), w kiszonce z kukurydzy 23% (Kirschner), w kiszonce z ziemniaków 20% (Fittbogen i Foerster), a w kiszonce z koniczyny 10% (König, patrz Löhnis, 1935). Grouven, zakiszając liście buraczane w zbiornikach zbudowanych z materiałów przepuszczalnych, stwierdził 35% strat suchej masy w ciągu 4 miesięcy. Kellner, stosując dla tego samego surowca zbiorniki hermetyczne, zmniejszył straty suchej masy do około 20% (Löhnis, 1935). Virtanen sądzi, że przez zahamowanie oddychania roślin i zapobiegnięcie rozpadowi białka aż do amoniaku można zmniejszyć straty do 5%. Jednocześnie kwasota w granicach pH 4,2 i niższa zabezpieczałaby kiszonkę przed rozwojem laseczek fermentacji masłowej (Ruschmann i Harder, 1931, Virtanen, 1947, Richard, 1947).

Skład chemiczny kiszonek

Aby kiszonka była pełnowartościowa, musi oprócz dużej strawności i dobrego aromatu zawierać odpowiednią ilość kwasu mlekowego (1,8 — — 2,0%), mało kwasu octowego (do 0,63%) i nie powinien znajdować się w niej kwas masłowy (Kolowca, 1947, Zubrilin, 1947).

Wartość kiszonki zależy, jak już wspomniano, od pory zbioru surowca roślinnego. Jak to wykazali Zubrilin (1947) i Virtanen (1947), najwięcej karotenu jest w koniczynie przed okresem kwitnienia. Ilość jego wynosi w tym czasie wg Virtanena około 0,2 mg na gram suchej masy rośliny. Po okwitnieniu ilość karotenu spada gwałtownie do około 0,05 mg na gram suchej masy. Także w czasie suszenia spadek karotenu jest duży, natomiast w kiszonkach, według niektórych autorów, ilość jego wzrasta, prawdopodobnie kosztem ksantofilu (Zubrilin i współpracownicy, 1950). Quackenbush i jego współpracownicy (1938) stwierdzili zwyżki karotenu w silażach z lucerny. Kiszonki te były przyrządzane za pomocą metody „A. I. V". Znaleziono w nich 5 nie znanych dotychczas pigmentów zbliżonych do karotenu, których nie znajdowano w świeżym materiale. Pigmenty te oznaczono jako A, B, C, E i F. Ustalono następnie, że A, B i E powstają pod działaniem kwasów z lutein. Pochodzenia pozostałych barwików dotychczas nie wyjaśniono. W doświadczeniu tym przekonano się, że z barwików oznaczonych jako A i B może powstawać witamina A.

Inni badacze stwierdzili, że w lucernie znajduje się sporo witaminy D, przy czym w liściach jest jej około 6 razy więcej niż w łodygach (Wallis, 1938).

Od niedawna zaczęto stosować dodawanie do ziemniaków tzw. „chwastu

rybnego". Uzyskane wyniki mogą świadczyć o dużej wartości tak przyrządzonych kiszonek (Kirsch, Jantzon, i Sieden, 1943, Kołowca, 1953, Szember, 1953).

Ostatnio przekonano się, że nawet tak wysokobiałkowe produkty, jak wędliny można z powodzeniem zakwaszać na drodze biologicznej (Tittsler i współpracownicy, 1952). Fakt ten rozpraszałby obawy co do możliwości powstawania wadliwych procesów fermentacyjnych w kiszonkach sporządzanych z pasz wzbogacanych w białko produktami pochodzenia zwierzęcego. Liczne prace wykazały dużą wartość kiszonek przyrządzanych z samych ryb (np. z wątroby rybiej) i zakwaszanych za pomocą metody „A. I. V". W kiszonkach takich znaleziono duże ilości witaminy D, której wcale nie szkodził kwaśny odczyn kiszonki. Kiszonkami tymi karmiono z powodzeniem kurczęta (Olsson, 1942).

Inni badacze stwierdzili, że ryby słodkowodne zawierają substancję pokrewną witaminie A_1, ale różniącą się od niej inną adsorpcją promieni ultrafiołkowych. Substancję tę oznaczono jako witaminę A_2 i stwierdzono, że ryby (płocie i okonie) mają zdolność jej syntetyzowania z karotenu (Morton i Creed, 1940). Schneider i współpracownicy (1940) znaleźli w rybach dużo witaminy B_6, której tak mało jest w owocach i w zielonych roślinach.

Z danych tych wynikałoby, że kiszonki sporządzane np. z parowanych ziemniaków z dodatkiem drobnicy rybnej mogą okazać się bardzo wartościowe nie tylko ze względu na dużą zawartość białka, ale również na obecność w nich witamin A, B i D.

Mikroflora świeżych roślin

Metody konserwowania pasz na gorąco, tak samo jak metoda, „A. I. V", wykluczają prawie zupełnie udział mikroflory właściwej fermentacji mlekowej. Bakterie fermentujące cukry na kwas mlekowy rozwijają się prawidłowo jedynie w warunkach „zimnego" konserwowania pasz, tj. w temperaturze do 20°. Dostatecznie ubita i wilgotna pasza zakwasza się wtedy samorzutnie, gdyż w materiale roślinnym znajdują się bakterie fermentacji mlekowej w ilościach dostatecznych. Stwierdzono to w licznych badaniach, uzyskując dobre kiszonki na drodze samofermentacji, przy czym okazało się, że szczepienie roślin zawierających odpowiednią ilość cukru („minimum cukrowe") bakteriami kwasu mlekowego jest zbędne (Scharrer i Schreiber, 1942).

Wspomnieć należy, że przy wyrobie kiszonek wskazane jest uprzednie badanie roślin na obecność na nich mikroflory chorobotwórczej. Według Rinklebena i Bartrama (1941) analizy takie pozwalały uchronić zwierzęta przed zachorowaniem.

Alejew i Czistiakow (1945) podają, że liczba bakterii na powierzchni 1 cm^2 liści waha się w granicach od 3782 do 74 373, co zależy od warunków środowiska oraz od wieku i gatunku rośliny. Na ogół na świeżych roślinach bakterie fermentacji mlekowej znajdują się w niedużej ilości. Najliczniej występują wg Burriego i Düggelego *Bac. mesentericus*, a następnie *Pseudomonas fluorescens* (Löhnis, 1935), a więc mikroflora amonifikująca.

Mimo stosunkowo małej ilości bakterii fermentacji mlekowej na żywych roślinach, w normalnej kiszonce szybko się one rozmnażają, czego dowodem jest prawie zawsze doskonały wynik zakiszania kapusty, ogórków (Morgenstern, 1926), a nawet naci ziemniaczanej (Beck-Altdanum, 1936). Wystarczy masę roślinną dobrze ubić w zbiorniku i chronić ją przed dostępem powietrza, aby otrzymać dobrą kiszonkę.

Mikroflora kiszonek

W produktach zakiszonych samorzutnie najpierw zaczynają działać bakterie niewłaściwej fermentacji mlekowej, takie jak *Aerobacter aerogenes, Tetracoccus* i inne. Szybko jednak wypierają je silniej kwaszące ziarniaki właściwej fermentacji mlekowej, które z kolei ustępują miejsca wolniej, ale jeszcze silniej kwaszącym pałeczkom (Orla-Jensen i współpracownicy, 1947).

Ilość mikroorganizmów kwaszących i innych grup bakterii przedstawia się w kiszonkach następująco:

Ilości bakterii w tysiącach na 1 g świeżej masy kiszonki ze słonecznika, wg. Miszustina (Zubrilin, 1947)

Grupa bakterii	Ilość początkowa	12 godzin	8 dni	20 dni
Ogólna ilość	6 000	2 200 000	200 000	2 000
Kwaszące	mało	1 300 000	180 000	2 000
Coli-aerogenes	0,250	0,250	0	0,05
Clostridium	0,250	0,250	0	0
pH kiszonki	6,3	—	4,3	4,0

Wzrost kwasowości w sialżu pobudza rozwój drożdży a przy dostępie powietrza także pleśni (Orla-Jensen i współpracownicy, 1947).

Wg Jensena tworzenie się mleczanów wzmaga rozwój bakterii propionowych i masłowych a także betabakterii. Bakterie fermentacji propionowej nie rozwijają się z reguły przy pH niższym niż 5,0, a według Virtanena laseczki kwasu masłowego nie rosną przy pH 4,2 i niższym.

Z wyżej wymienionych grup drobnoustrojów najbardziej odpornymi na działanie niskiego pH okazały się betabakterie, które mogą rozwijać się np. w zakwaszonym winie nawet przy pH 2,75, a także wytrzymywać stężenie 20% alkoholu (Orla-Jensen i współpracownicy, 1947, Kwasnikow, 1952. Tittsler i współpracownicy, 1952). Betabakterie byłyby więc tym czynnikiem, który kończy zakiszanie pasz zielonych doprowadzając pH do około 4,0 i przyczyniając się do powstawania aromatu kiszonek (Orla-Jensen i współpracownicy, 1947). Także Tittsler, i współpracownicy wskazują na szczepy bakterii mlekowych produkujące acetoinę jako na głównych producentów aromatu kiszonek.

W kiszonkach z pasz zielonych, w których w przewadze było *Streptobacterium*, znaleziono również bakterie typu *Betacoccus*. Nadto znaleziono

Betabacterium caucasicum fermentujące arabinozę, które jest prawdopodobnie identyczne z *Lactobacillus pentoaceticus*, wykrytym przez Freda i Petersona w silażach z kukurydzy (Orla-Jensen, 1947 b).

Dynamika rozwoju mikroorganizmów kwaszących w kiszonkach

Przebieg rozwoju mikroorganizmów kwaszących w kiszonkach może być rozmaity. Esten i Mason stwierdzają największy wzrost ilości bakterii kwaszących już po pierwszym dniu fermentacji, po czym następuje spadek. Po trzech dniach fermentacji notują ponowny wzrost, po czym znowu spadek i to gwałtowny. Trzecie z kolei maksimum, znacznie mniejsze od poprzednich, występuje po siedmiu dniach fermentacji. Od tego momentu zaznacza się stopniowy, ale stały ubytek ilości mikroflory kwaszącej w kiszonce (Löhnis, 1935).

Równocześnie obok wyżej podanego przebiegu zmian w ilości bakterii kwaszących w kiszonce z kukurydzy opisuje Löhnis inny przebieg zmian ilości tych bakterii, stwierdzony w takim samym surowcu przez Petersona, Hastingsa i Freda. Krzywa, wykreślona na podstawie zmian ilości bakterii kwaszących w kiszonce badanej przez tych ostatnich badaczy, różni się tym od poprzedniej, że pierwsze maksimum, które występuje również pierwszego dnia fermentacji, jest w niej niższe od następnego, pojawiającego się po pięciu dniach. Maksima te są przedzielone głęboką depresją. Począwszy od szóstego dnia fermentacji krzywa ta stale opada. Podobne wyniki uzyskała Fornalska (1951). W kiszonkach, sporządzonych przez nią z ziemniaków z dodatkiem 40% koniczyny, maksimum ilości bakterii kwaszących wystąpiło po siedmiu dniach fermentacji. Natomiast badania przeprowadzone przez Szembera (1952, 1953) nad rozwojem mikroorganizmów kwaszących w kiszonkach ziemniaczanych z różnymi dawkami koniczyny i w kiszonkach z ziemniaków z dodatkiem tzw. „chwastu rybnego" wykazały, że maksimum ilości bakterii kwaszących występowało zawsze po 2 — 3 dniach fermentacji. Tak różne wyniki wskazywałyby na to, że na dynamikę rozwoju mikroorganizmów kwaszących może wpływać bardzo wiele czynników (Zubrilin, 1947).

Drożdże

Bardzo ciekawe dane cyfrowe, obrazujące rozwój drożdży w kiszonkach, podają Peterson i współpracownicy (1925) oraz Zubrilin (1947). Według tych autorów, najwięcej drożdży jest w momencie zakiszania paszy, po czym ilość ich stopniowo spada. Zubrilin (1947) zamieszcza tabelkę ilustrującą spadek ilości drożdży w czasie fermentacji kiszonki z kukurydzy. Jednocześnie podaje wręcz przeciwne wyniki uzyskane podczas wyrobu kiszonki z ziemniaków. Także w kiszonkach ziemniaczanych z dodatkiem koniczyny, badanych przez Szembera, i w kiszonkach ziemniaczanych z dodatkiem tzw. „chwastu rybnego" obserwujemy stały wzrost ilości drożdży wraz z postępem fermentacji kiszonki (Szember, 1952, 1953). Zmiany w ilości drożdży poddczas fermentacji kiszonki zależałyby więc od rodzaju surowca zakiszanego.

Ruschmann i Gräf (1932) opisując występowanie drożdży w kiszonkach stwierdzają, że organizmy te przyczyniają się do polepszenia aromatu tych produktów. Nadto drożdże wywierają dodatni wpływ na żywotność bakterii fermentacji mlekowej. Natomiast bakterie te działają na drożdże antagonistycznie. Inne poglądy na to zagadnienie wysuwają Zubrilin i współpracownicy (1950), którzy zastanawiając się nad przyczynami obniżania się ilości drożdży w silażach doszli do wniosku, że nie może tu być mowy o antagonizmie, gdyż drożdże bardzo często współżyją z bakteriami kwasu mlekowego w różnych napojach mlecznych, jak kumys czy kefir. Sądzą oni, że zahamowanie rozwoju drożdży w kiszonkach następuje raczej jako skutek spadku potencjału oksydo-redukcyjnego, niższego podczas fermentacji mlekowej niż przy fermentacji alkoholowej. Zbyt silny rozwój drożdży w kiszonkach i wywoływana przez nie fermentacja alkoholowa będzie obniżała wartość kiszonki.

Praca Pijanowskiego i Wojtarskiej (1951) nad kiszeniem kapusty, do której dodano drobne ilości kwasu benzoesowego, wykazuje, jak dalece można kierować przebiegiem procesów biologicznych za pomocą tego inhibitora. W doświadczeniu tym kwas benzoesowy hamował nadmierny rozwój drożdży, co przyczyniło się do zaoszczędzenia cukru i podwyższenia kaloryczności kiszonek. Przekonano się nadto, że kwas benzoesowy wywiera korzystny wpływ na trwałość witaminy C w kiszonej kapuście.

Jednakże pewna ilość drożdży w kiszonkach jest korzystna ze względu na obecność w nich cennych witamin i ciał wzrostowych (np. kompleks wit. B).

Zmiany pH

Prawidłowo przebiegająca fermentacja w kiszonce powoduje wg Zubrilina (1947) następujący spadek pH:

Surowiec kiszonki	pH początkowe	wartość pH po :				
		3	8	15	30	45 dniach
Kukurydza	5,9	4,4	4,0	4,0	4,0	—
Wyka z owsem	5,8	—	4,5	4,2	4,2	4,2
Ziemniaki parowane	6,1	3,8	—	3,6	3,6	—

Bakterie fermentacji masłowej

Groźnym szkodnikiem kiszonek są bakterie fermentacji masłowej. Aby zabezpieczyć kiszonkę przed rozwojem tych bakterii, staramy się o możliwie szybkie obniżenie pH w zakiszanych roślinach. Przy samofermentacji efekt ten trudno niekiedy osiągnąć.

Ruschmann (1941 a) jest zwolennikiem samozakiszania się pasz i poddaje krytyce metody sztucznego zakwaszania. W badaniach nad rozwojem *Clostridium* w kiszonkach stwierdza, że bakteria ta rozwija się tylko przy niedostatku w paszy silosowanej łatwo fermentujących węglowodanów. Obliczył on ilość laseczek fermentacji masłowej na trawie pochodzącej z łąk nawadnianych. Ilość ta jest znaczna, bo dosięga 10 milionów komórek na 1 g trawy. Ruschmann stwierdza, że przez dodatek cukru nawet taką

paszę możemy zabezpieczyć przed fermentacją masłową, stwarzając korzystne warunki dla rozwoju bakterii fermentacji mlekowej.

Ciekawe spostrzeżenia nad wytrzymałością *Clostridium butyricum* na zakwaszanie sialżu zanotował R i c h a r d (1947). Stwierdził on mianowicie, że poddana silosowaniu nierozdrobniona koniczyna po ukończeniu procesu zakiszania miała pH 4,5 — 4,6 i 0,8% kwasu mlekowego. Pomimo stosunkowo słabego zakwaszenia nie wykryto w niej zwiększania się ilości *Clostridium*. Wyizolowane z tej kiszonki cztery szczepy laseczek fermentacji masłowej rozwijały się z powodzeniem przy niższych pH, które autor uzyskał sztucznie za pomocą dodatku kwasów mineralnych. Przy dalszych próbach *in vitro* okazało się, że gdy do zakiszanego produktu, którego pH było jeszcze wysokie, bo wynosiło 6,0, dodano 2,5% kwasu mlekowego, nie hamowało to rozwoju *Clostridium*. Jednakże przy zwiększającym się stężeniu jonów wodorowych wzrost tych bakterii był hamowany już przez znacznie mniejsze dawki kwasu mlekowego. Np. przy pH 5,0 wzrost ich został zahamowany już przez dodatek 0,5% kwasu mlekowego.

Ciekawe są także spostrzeżenia poczynione przez M a t t i c k a (1947), G r o s s o w i c s a i współpracowników (1947) i przez P o ł o ń s k ą (1952). Autorzy ci stwierdzili, że paciorkowce mleczne wydzielają specjalne substancje powstrzymujące rozwój innych bakterii, m. in. także *Clostridium*. Byłoby to może wytłumaczeniem tego, że mimo małej ilości bakterii mlekowych w surowcu wyjściowym potrafią one dzięki specjalnym uzdolnieniom opanować bardzo szybko środowisko i zabezpieczyć zakiszany produkt przed rozwojem niepożądanych zespołów mikroflory. Należy tylko zapewnić im odpowiednie warunki rozwoju w zakiszanej paszy (m. in. dostateczne ilości łatwo fermentującego cukru).

Na ogół stwierdzono, że z pasz węglowodanowych, zawierających tzw. „minimum cukrowe", otrzymuje się z łatwością dobre kiszonki. Opracowano już także sposoby zakiszania pasz białkowych przez wzbogacanie ich w cukry lub przez stosowanie sztucznego zakwaszania. Nie rozwiązano jeszcze zagadnienia, jak otrzymać z pasz węglowodanowych kiszonki specjalnie wartościowe dla zwierząt, a więc zawierające oprócz węglowodanów także znaczne ilości białka. Obecnie opracowuje się, jak widzimy, sposoby przyrządzania pełnowartościowych kiszonek z pasz ubogich w białko, poszukując nadających się do tego celu surowców.

W Polsce wobec olbrzymiej produkcji ziemniaków wyrób z nich pełnowartościowych kiszonek wydaje nam się problemem ważnym gospodarczo. Toteż opierając się na stosunkowo nielicznych jeszcze osiągnięciach badaczy zagranicznych, autor niniejszego referatu przeprowadził w latach 1950 — 1953 znaczną ilość badań nad mikroflorą i przebiegiem zakwaszania kiszonek z ziemniaków, do których dodawał różne ilości roślin motylkowych lub odpadków pochodzenia zwierzęcego (drobnica rybna). Wyniki tych prac stanowią przedmiot osobnych publikacji (S z e m b e r, 1952, 1953), w których wykazano, że z wyżej wymienionych surowców przez zachowanie odpowiednich ich proporcji w mieszance można otrzymać bardzo dobre kiszonki przy współudziale normalnej mikroflory kwaszącej.

LITERATURA

1. Alejew B. S. i Czistiakow F. M., 1945: Mikrobiologia konsierwirowanja cz. III, z. I, Mikrobiologja piszczewoj promyszlennosti, Piszczepromizdat, Moskwa.
2. Beck-Altdanum Fr., 1936: Ukwaszona nać ziemniaczana jako pasza dla krów mlecznych, z *Zeitschrift f. Spiritusindustrie,* wg *Przemysłu Rolnego* nr 9, 1936.
3. Bierezowski A. A., 1951 a: Prijomy prigotowlenja spiecjalnych siłosow, *Sowietskaja Zootiechnia:* **62.**
4. Bieriezowski A. A., 1951 b: Założyt bolszyje siłosa w osiennij pieriod. *Sow. Zootiechnia:* **84.**
5. Brigl P., Windheuser C., 1932: Über Einsäuerungsversuche mit Tipinamburkraut, *Biedermanns Zentralblatt,* Abt. B, **4**:163.
6. Christensen F. W. i Hopper T. W., 1938: Verdauliche Nährstoffe u. nutzbare Energie bei verschiedenen Silagen, Heuarten und Futtermischungen, J. Agr. Research 57, wg *Zeitschrift f. Tierernährung u. Futtermittelkunde,* 1940, **3**:80.
7. Dijkstra N. D., 1937: Futterwert von Topinambur, Landbouwkunding Tijdschr. 49 No 606, wg *Z. f. T. u. Futtermittelkunde* 1939 **2**:100.
8. Emelianow A. S., 1951: O normirowanii kormlenja sielskochoziajstwiennych żiwotnych, *Sow. Zootiechnia,* **3.**
9. Etchells J. L. i Jones I. D., 1949: Bacteriological Changes During the Fermentation of Steamed Potatoes for Silage, *Jour. of Agric. Research,* **78**:19.
10. Flieg O., 1940; Über den Ameisensäuergehalt von Gärfutterproben und den „Ameisensäuerfehler" bei der Bestimmung von Essig-Butter-und Milchsäure, *Z. f. T. u. Futtermittelkunde,* **3**:53.
11. Fornalska I., 1951: Mikroflora kwasząca w kiszonkach ziemniaczanych, praca w maszynopisie.
12. Glaubitz, 1924, Kiszenie ziemniaków, *Z. f. Spiritusindustrie,* wg *Przemysłu Rolnego* nr 5—6, 1926.
13. Gneist K., 1940: Untersuchungen über den Einfluss gesäuerter Hackfrüchte als Sicherungszusatz bei der Bereitung eiweissreichen Grünfutters, *Z. f. t. u. Futtermittelkunde,* **4**: 113.
14. Grossowics K., Kaplan D., Schneerson S., 1947: Production of an Antibiotic Substance by a *Lactobacillus, Fourth Int. Microbiol. Congr.,* Kopenhaga. 137.
15. Gałdin M. W., 1951: Nowoje w miechanizacii podgotowki kormow, *Sow. Zootiechnia,* **12**: 75.
16. Herzig J., 1946: Bramborova sílaž, jeji priprava a zkrmovani, Brazda, Praha.
17. Jankiewicz K., 1948. Ziemniaki kwaszone jako pasza, Inst. Nauk. Wydawn. Ruchu Lud. „Polska", Poznań.
18. Jarl F., 1951 a: Ensileringsförsök vid Tönnersa, Särtryck ur orsbok, Hallands läns hushollningssällskap.
19. Jarl F., 1951 b: Einsileringsmetoder. Särtryck ur. Nordisk Jordbrugsforsking **4**: 670.
20. Kirsch W. i Jantzon H., 1940: Einsäuerungsgemische von Kartoffeln u. Leguminosen und ihr Futterwert für das Schwein, *Z. f. T. u. Futtermittelkunde,* **4**: 284.
21. Kirsch W., Jantzon H. i Sieden F., 1943: Konservierung von Fischen durch Einsäuerung mit Kartoffeln bzw. Ameisesäure (Amasil) und ihre Verwertung durch das Schwein, *Biedermanns Zentralblatt,* Abt. B, **15**: 209.
22. Keil W., 1941: Zur Frage der Schädlichkeit von Ameisensäure als Sicherungszusatz bei der Gärfutterbereitung, *Biedermanns Zentr.,* Abt. B, **13**: 221.

23. Kolowca J., 1947: Kiszonki, *Pol. Tow. Zootechn.*, Kraków.
24. Kolowca J., 1953: „Chwast rybny" jako źródło białka w kiszonkach ziemniaczanych, w przygotowaniu do druku.
25. Kwasnikow E. I., 1952: Spirtoustojcziwost' mołocznokisłych baktierij, *Mikrobiołogja*, 21: 160.
26. Löhnis F., 1935: Vorkommen u. Tätigkeit von Mikroorganismen in den Futtermitteln. Handbuch der Landwirtschaftliche Bakteriologie. Bd 1, Teil 1. P. Parey, Berlin.
27. Liebscher W., 1938: Futterungsversuche mit eingesäuerten Kartoffeln bei Lege-und Zuchthühner, *Biedermanns Zentralblatt*, Abt. B, 10: 385.
28. Łysogorow W. I., Sołtykow F. I. i Werbicz O. A., 1951: Koncientrirowannyj siłos, *Sow. Zootiechnia*, 64.
29. Malarski H. i Szymański A., 1933: Wyniki badań nad dobrocią i wartością odżywczą kiszonek produkowanych przez stacje doświadczalne 1930/32, *Pol. Tow. Zootechniczne*, 2: 102.
30. Morgenstern F.: Przygotowanie kiszonej kapusty i kiszonych ogórków, *Die deutsche Essigindustrie*, Bd. 28, wg *Przemysł Rolny* 1926.
31. Morton R. A. a. Creed R. H., 1939: Die Umwandlung von Carotion in Vitamin A_2 durch einige Süsswasserfische, *Biochem. J.* 33. wg *Z. f. T. u. Futtermittelkunde*, 1940, 4: 122.
32. Mattick A. T. R., 1947: The lactic Streptococci (including their antibiotic activity), *Fourth Intern. Microbiol. Congress*. Kopenhaga 1947, 519.
33. Olsson N, 1952: Förök rörande fishprodukternas tillvaratagande och användbarhet som foder för höns och kycklingar. Lantbrukshögskolan Husdjursförsöksanstalten. *Meddelande* Nr. 7.
34. Orla-Jensen S., Orla-Jensen A. D. a. Kjaer A., 1947 a: On the Ensiling of Lucerne by Means of Lactic Acid Fermentation, *Antonie van Leeuwenhoek*, 12: 97.
35. Orla-Jensen S., 1947 b: On the identification of lactic acid bacteria especially in silage, *Fourth Int. Microbiol. Congr.*, Kopenhaga 1947, : 503.
36. Quackenbush F. W., Steenbock H. i Petersen W. H., 1938: Die Einwirkung von Säuren auf Carotinoide, *J. amer. Chem. Soc.*, 60, wg *Z. f. T. u. Futtermittelkunde*, 1940, 3: 181.
37. Peterson W. H., Hastings E. H. a. Fred E. B. 1925: A Study of the Principal Changes which take Place in the Making of Silage. *Agr. Exp. St. Univer. Wisconsin Madison*, Bull. 61.
38. Pette I. W., 1947: The Effect of the Addition of Sugar and Whey to Grass Silage on the Flora of Lactic Acid Bacteria. *Fourth Int. Microbiol. Congr.*, Kopenhaga, 505
39. Pijanowski E. i Wojtarska M., 1951: Wpływ kwasu benzoesowego na przebieg fermentacji i skład chemiczny kapusty kiszonej, *Roczniki Nauk Rolniczych*, 57: 29.
40. Połonska M. S., 1952: Antibioticzeskije wieszczestwa acidofilnych baktierij, *Mikrobiołogja*, 21: 303.
41. Ruschmann G. i Harder L., 1931: Występowanie i znaczenie bakterii fermentacji masłowej w paszy silosowej, *Zent. f. Bakt.*, A. II, 83, 325, wg *Przemysł Rolny* nr 5—6, 1932.
42. Ruschmann G. i Gräf G., 1932: Występowanie i znaczenie grzybków drożdżowych w paszach silosowych, *Z. f. Bakt.*, A. II, 85, wg *Przemysł Rolny* nr 9—10, 1932.

43. Ruschmann G., 1933: Die Einsäuerung von Topinamburkraut, *Biedermanns Zentralblatt*, Abt. B, **5**: 597.
44. Ruschmann G., 1938: Herstellung und Verfütterung von Sauerkartoffeln, *Flugblätter des Reichsnährstandes* nr 3, Berlin.
45. Ruschmann G. i Bartram H., 1940: Über die Bedeutung des Pflanzensaftes bei der Einsäuerung jungen eiweissreichen Grünfutters, *Z. f. T. u. Futtermittelkunde*, **4**: 89
46. Ruschmann G., 1940: Natürliche Gärfutterbereitung durch ein neues biologisches Verfahren, *Z. F. T. u. Futtermittelkunde*, **3**:263.
47. Ruschmann G, 1941 a: Natürliche oder künstliche Gärfutterbereitung, *Deutsche Landwirtschaftliche Presse*, Sonderdr., aus nr 37 i 38.
48. Ruschmann G., 1941 b: Weshalb keine natürliche Gärfutterbereitung, Sonderdr., *T. f. T. u. Futtermittelkunde*, 6.
49. Ruschmann G., Bartram H., 1953: Einsäuerung von Saft aus jungem eiwessreichem Grünfutter, *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*, 6: 252.
50. Rinckleben P., Bartram H., 1941: Bedeutung der bakteriologischen Futtermitteluntersuchungen, Sonderabdruck aus *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*, **6.**
51. Richard O., 1947: Die Beziehungen des beweglichen Buttersäurebacillus *(Clostridium butyricum* Praż.) zum Silofutter, *Fourth Int. Microbiol. Cong.*, Kopenhaga: 522.
52. Scheunert A., 1938: Notiz über Vitamin Gehalt der Topinamburknollen, *Biedermanns Zentralblatt*, Abt. B. **10**: 449.
53. Steenbock H., 1939: Die hautschützenden Eigenschaften verschiedener Nahrungsmittel, *J. Nutrition*, 18, wg *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*, 1940, **5**:110.
54. Sauer F., 1939: Untersuchungen über den Einfluss einiger neuer Sicherungszusatz (Alfasil, Lesal, P_2O_5 — Präparat) bei der Gärfutterbereitung für Stoffwechsel des Wiederkäuers und auf die Güte des Gärfutters bei verschieden langer Lebensdauer, *Futterbau u. Gärfutterbereitung*, wg *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*, 1940, **3**:90.
55. Scharrer K. i Schreiber R., 1941 a: Über die Verdaulichkeit von gedampften eingesäuerten Kartoffeln bei Schaffen, *Bied. Zentralbl.*, Abt. B. **13**:229.
56. Scharrer K., Schreiber R., 1941 b: Einsäuerungsversuche mit *Phacellia* unter Verwendung eines neuen Sicherungszusatzes u. Verdauungsversuche mit den hergestellten Gärfutterarten an Schaffen, *Bied. Zentralblatt*, Abt. B, **13**: 432.
57. Scharrer K., Schreiber R., 1942: Über die Verwendung von Sauerkartoffeln bei der Einsäuerung von Luzerne, *Bied. Zentralbl.*, Abt. B, **14**: 317.
58. Scharrer K. i Schreiber R., 1944: Über die Verwendung von Milchsäure als Sicherungszusatz bei der Gärfutterbereitung, *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*. **7**: 260.
59. Speer W., 1942: Weshalb keine natürliche Gärfutterbereitung, *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*, **6**: 149.
60. Szember A., 1952: Kiszonki ziemniaczane i ich mikroflora, *Acta Microbiologica Polonica*, **I**: 339.
61. Szember A., 1953: Wpływ dodatku tzw. „chwastu rybnego" na rozwój mikroflory w kiszonkach ziemniaczanych, praca w przygotowaniu do druku.
62. Tittsler R. P., Pederson C. S., Snell E. E., Hendlin D., Niven C. F. IR., 1952: Symposium on the Lactic Bacteria, *Bact. Rev.* **16**:227.
63. Ulvesli O., 1938: I. Gärfutter von Kartoffeln und Spinat. II Verluste von Trockensubstanz bei Lagerung von Kartoffeln in Keller, z Inst. f. Tierernährung u. Futterungslehre der Landwirtschaftlichen Hochschule Norwegen, Berichte nr 54, wg *Z. f T.* u. *Futtermittelkunde*, 1940, **3**: 283.

64. Virtanen A. I., 1947: Silage by the AIV method, *The Economic Proceedings of the Royal Dublin Society*, **3**: 311.
65. Windheuser C., 1939: Über einen Einsäuerungsversuch mit Zusatz von Ammonbikarbonat und Futterungsversuch mit dem erhaltenen Gärfutter an Milchkühen, *Bied. Z. blatt*, Abt. B, **11**: 139.
66. Windheuser C., 1935: Über Einsäuerungsversuche mit Zusatz von Ammoniak und Ammoniaksalzen, *Bied. Z. blatt.*, Abt. B, **7**: 372.
67. Wöhlbier W. i Siebert R., 1940: Versuche über Verfütterung von Ameisensäure, *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*, **4**: 107.
68. Wallis G. C., 1938: Vergleich des Gehalts an Vitamin D in den Stengeln und Blättern von Luzernenheu, *J. Agr. Research* **57**, wg *Z. f. T.* u. *Futtermittelkunde*, 1940, **3**: 79.
69. Zubrilin A. A., 1947: Naucznyje osnowy konsierwirowanja zielonych kormow. Ogiz — Sielchozgiz, Moskwa.
70. Zubrilin A. A., Miszustin E. N. i Harczenko W. A., 1950: Siłos, Sielchozgiz, Moskwa.
71. Zacharjew N. I., 1952: Letnieje ispolzowanje siłosa w sistiemie zielonogo konwiejera, *Kormowaja Baza*, 57.

BIBLIOGRAFIA POLSKIEJ MIKROBIOLOGII GLEBOWEJ LATA 1945 — 1952

БИБЛИОГРАФИЯ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ В ПОЛЬШЕ ЗА ВРЕМЯ С 1945 ПО 1952 Г.

INDEX OF POLISH AGRICULTURAL-MICROBIOLOGICAL LITERATURE FOR THE YEARS 1945 — 1952

zebrała *J. Strzemska*

Dział Mikrobiologii I. U. N. G. w Puławach

Wpłynęło dnia 20.X.1953 r.

I. MIKROFLORA I MIKROFAUNA GLEBY

1. Aleksandrow W. i Żak G.: Bakterie rozkładające glinokrzemiany (bakterie krzemianowe). **A-r.** Przekł. z ros. R. Majchrzaka, *Post. Wiedzy Roln.*, Seria przekładów: z 6. Problemy mikrobiologii gleby, P. W. R. i L., Warszawa 1952, str. 79—88.
2. Balicka N.: Wpływ uprawy roli na jej fizyczne i mikrobiologiczne własności. K. *Sprawozdania* PAU t. LI, 9, Kraków 1950, str. 603.
3. Balicka N.: Niektóre zagadnienia z dziedziny oddziaływania roślin wyższych na drobnoustroje. **A.** *Post. Wiedzy Roln.*, **I.**, P. W. R. i L., Warszawa 1951, str. 125—131.
4. Balicka N.: Wpływ uprawy roli na jej fizyczne i mikrobiologiczne własności. Rozprawa, złożona do druku w *Roczn. Nauk Roln.* w 1951 r.
5. Balicka N.: Wpływ uprawy roli na proces rozkładu błonnika. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 4 (6), Warszawa 1952, str. 79.
6. Balicka N.: Drobnoustroje w płodozmianie wg systemu Wiliamsa. R. Złożono do druku *w Biuletynie IUNG* w r. 1952.
7. Balicka N.: Czy gleba żyje. *A. p.* Złożony do druku w wyd. T. W. P. w r. 1952.
8. Balicka N.: Zastosowanie mikrobiologii ekologicznej w gleboznawstwie. **R-z.** Złożony do druku w *Roczn. Glebozn.* w r. 1952.
9. Bierezowa J.: Stosunki między rośliną a mikroflorą gleby. **A-r.** Przekład z ros. S. Ehrlicha. *Post. Wiedzy Roln.*, Seria przekładów: z. 6. Probl. mikrobiologii gleby, P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 102—108.
10. Bizior J.: Własności serologiczne maczugowców glebowych. Praca magistr. nieopublik.. Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS.

11. Ciołek H.: Cykl rozwojowy bakterii śluzowych. **K.** *C. I. R.. Biuletyn* nr 4 (6). Warszawa 1952, str. 78.
12. Dikowski F.: Oznaczanie potrzeb tlenowych gleb jako metoda oceny możliwości rozwoju w nich aerobowych procesów mikrobiologicznych. **A-r.** Przekład z ros. C. Święcickiego. *Post Wiedzy Roln.* Seria przekładów: z 6. Problemy mikrobiologii gleby. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 136—141.
13. Dobrowolski J.. Wpływ płodozmianu łąkowo-polowego na nitryfikację i denitryfikację w glebach maj. Osiny. **K.** *C. I. R. Biuletyn* nr 4 (6) 1952, s. 80—81.
14. Dobrowolski J.: Wpływ płodozmianu łąkowo-polowego na nitryfikację i denitryfikację w glebie. Praca magist. nie opublikowana.
15. Doleżko H.: Bakterie rozkładające węglowodory. Praca magisterska nie opublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS.
16. Gauze G.: Niektóre problemy geografii drobnoustrojów. **A-r.** Przekład z ros. C. Święcickiego. *Postępy Wiedzy Rolniczej,* Seria przekładów: z. 6. Problemy mikrobiologii gleby. P. W. R. i L., Warszawa 1952, str. 51—61.
17. Gołębiowska J.: Przyczynek do badań nad rozkładem błonnika przez grzyby niższe występujące w glebie.
Contribution to the study of cellulose decomposition by soils molds. **R.** *Annales U.M.C.S. S. E.,* III, **10.** Lublin 1948, str. 207—219.
18. Gołębiowska J.: Charakterystyka promieniowców antybiotycznych izolowanych z nieżyznych gleb.
Characteristics of antibiotic Actinomycetes isolated from infertile soils. **R.** *Annales U.M.C.S. S. E., II,* **9,** Lublin 1947, str. 225 — 248.
19. Gołębiowska J.: Rola drobnoustrojów w powstawaniu i życiu torfowisk. Wydawn. Powiel. Wydziału Gleboznawczego PINGW, Oddział Lub.-Kiel. w Puławach, Puławy 1949, stron 9.
20. Gołębiowska J.: Wpływ nawożenia na zespoły mikroflory w nieurodzajnych torfach. K. *Sprawozdania z X Zjazdu Pol. Tow. Mikrobiol.* w Gdańsku w r. 1949.
21. Gołębiowska J.: Udział drobnoustrojów w powstawaniu próchnicy w glebie. **R-z.** Wydawn. Powiel. Wydziału Gleboznawczego PINGW, Oddział Lub.-Kiel. w Puławach, Puławy 1950, stron 11.
22. Gołębiowska J. i Falkowski M.: Wpływ nawożenia na zespoły mikroflory i makroflory łąki torfowej.
Влияние удобрения на комплекс макро — и микрофлоры луга на торфяной почве.
The influence of manure on microflora and macroflora groups of peat meadows. **R.** *Roczn. Nauk Roln.,* LXI, Warszawa 1952, str. 211—232.
23. Dobrzański B.: Życie gleby. *A.* Plon. R. I. N. 10, Warszawa 1950, str. 6—7.
24. Dobrzański B.: Rola biosfery w glebie. Artykuł. Sztandar Ludu r. VII, nr 145 (27.V). Lublin 1951.
25. Duda J.: Życie w glebie. Artykuł. Poradnik Plantatora. **R.** II, nr 3, 1947.
26. Duda J.: Niewidzialni robotnicy. Artykuł. Nowy Świat — Dodatek tygodniowy do Głosu Wielkopolskiego, III, nr 9, Poznań 1952.
27. Imszeniecka J.: Wpływ porostów na rozwój azotobaktera. **A-r.** Przekład z ros. R. Majchrzaka. *Post. Wiedzy Roln.:* Seria przekładów z. 6. Problemy mikrobiologii gleby, P. W. R. i L., Warszawa 1952, str. 142—146.
28. Jurkowska H.: Organizmy gleb leśnych. **A.** *Wszechświat,* 2 (1785). Kraków 1949, str. 38—41.

29. Jurkowska H.: Pięćdziesięciolecie azotobaktera. **A.** *Wszechświat*, 1 (1803), Kraków, 1951, str. 1—6.
30. Kobus J.: Orientacyjne badania mikroflory gleb wysokogórskich. **K.** *Biuletyn C. I. R.* nr 2 (4), Warszawa 1952, str. 106—107.
31. Kostecka O.: Wpływ wyciągów z gleby na rozwój *Azotobacter chroococcum* Beij. Influence of soil extracts on the growth of *Azotobacter chroococcum* Beij. **R.** *Acta Soc. Bot. Polon.* (XX 1949—50), Warszawa 1950/51, str. 169—200.
32. Kowalska J.: Badania nad maczugowcami glebowymi. Praca magisterska nie opublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin.
33. Król S.: Rezultaty badań nad mikrofauną w borach sosnowych. **K.** *Sylwan*, XCVI, 3, Warszawa 1952, str. 320—321.
34. Król S.: Rezultaty badań nad mikrofauną gleb w borach sosnowych. **K.** *C. I. R. Biuletyn* nr 2 (4), Warszawa 1952, str. 78—79.
35. Krzemieniewska H.: Bakterie korzystające ze związków mineralnych jako źródła energii. **A.** *Wszechświat*, 4 (1762), Kraków 1946, str. 116—121.
36. Krzemieniewski S. i Krzemieniewska H.: Myxobacteria of the genus *Chondromyces* Berkeley et Curtis (Miksobakterie rodzaju *Chondromyces* Berkeley et Curtis). **R.** *Bull. Intern. Acad. Sci Cracovie* nr 1—10, B. I., Kraków 1946, str. 31—48.
37. Kunicki-Goldfinger Wł.: Występowanie w glebach *Bact. globiformae*. **K.** *C. I. R. Biuletyn* nr 4 (6), Warszawa 1952, str. 78.
38. Kunicki-Goldfinger Wł.: Budowa i cykl rozwojowy *Sporocytophaga* Stanier. The structure and the life-cycle of *Sporocytophaga* Stanier. **R.** *Annales UMCS, S. C.*, IV, Lublin 1950, 395—425.
39. Kuźniar K.: Badania nad rozkładem błonnika w glebach leśnych. Studies on the celulose decomposition in forest soil. **R.** *Rozpr. i Sprawozd. Inst. Bad. Leśn., S. A., N.* 50, Kraków 1948, stron 40.
40. Kuźniar K.: Nowe metody określania aktywności gleby leśnej.
Новый метод определения активности лесной почвы.
New methods of determining the forest soils activity. **R.** *Sylwan*, XCIV (IV-, 3), Warszawa 1950, str. 49—57.
41. Kuźniar K.: Energia rozkładu błonnika w glebach Parku Narodowego w Pieninach.
Интенсивность разложения клетчатки в горных почвах Национального Парка в Пенинах.
The energy of cellulose decomposition in the soils of the National Park in Pieniny Mountains. **R.** *Acta Microbiol. Polon.*, I, 1, Lublin 1952, str. 52—57.
42. Kuźniar K.: Energia rozkładu błonnika w glebach Białowieskiego Parku Narodowego.
Энергия разложения клетчатки в почвах Беловежского Национального Заповедника.
The energy of cellulose decomposition in the soils of Białowieża National Park. **R.** *Acta Microbiol. Polon.*, I, 3, Lublin 1952, str. 257—269.
43. Kuźniar K.: Oznaczanie aktywności drobnoustrojów rozkładających w glebie węglowodany w okresie zimowym. **K.** *C. I. R. Biuletyn nr* 4 (6), Warszawa 1952, str. 79—80.
44. Lewandowska C.: Twórcza i burzycielska działalność mikrobów w kształtowaniu skorupy ziemskiej. **A.** *Wiedza i Życie* r. XVII, nr 12, Warszawa 1951, str. 1061—1070.

45. Lewandowska C.: Co się kryje w skibie gleby. **A.** *Wiedza i Życie* r. XIX, 10, Warszawa 1952, str. 944—954.

46. Maksimow A. i Dłubakowski S.: Nitryfikacja azotu torfów amoniakowanych.
Нитрификация азота аммонифицированных торфов.
Nitrification of ammoniated peat. **R.** *Roczn. Nauk Roln.* t. 66, S. A., z 1, P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 77—94.

47. Maliszewska W.: Charakterystyka mikrobiologiczna gleb lasu Ruda, PINGW w Puławach.
Микробиологическая характеристика почв леса „Руда" в Пулавах
The microbial characteristics of soils in the forest „Ruda" in Puławy **R.** Wydaw. Powiel. Wydz. Gleboznawczego PINGW. Oddział Lub.-Kiel. w Puławach, Puławy 1949, stron 10.

48. Maliszewska W.: Charakterystyka mikrobiologiczna gleb majątków naukowo-doświadczalnych Uniwersytetu M. C. S w Lublinie.
The microbial characteristics of soils on the farms of the M. C. S. University in Lublin. **R.** *Annales UMCS, S. E.* IV, 2, Lublin 1949, str. 37—76.

49. Maliszewska W.: Mikroflora gleb z doświadczeń statycznych w Roln. Zakładzie Doświadczalnym w Gołębiewie k. Kutna **K.** *C. I. R. Biuletyn* nr 2 (4), Warszawa 1952, str. 107.

50. Maliszewska W.: Charakterystyka mikrobiologiczna gleb z doświadczeń statycznych w Gołębiewie.
Микробиологическая характеристика почв на основании статических опытов в Голембеве.
The microbial characteristics of the soils from statical experiments in Agr. Exp. Station Gołębiew. **R.** *Acta Microbiol. Polon.,* I. 2, Lublin 1952, str. 123—136.

51. Margowski Z.: Zależność występowania bezkręgowej fauny w glebach od czynników siedliskowych. **K.** *Sylwan,* XCVI, z. 3, Warszawa 1952, str. 321—323.

52. Margowski Z.: Zależność występowania bezkręgowej fauny w glebach od czynników siedliskowych. **K.** *C. I. R. Biuletyn* nr 2 (4), Warszawa 1952, str. 81—83.

53. Marszewska-Ziemięcka J.: Badania nad znaczeniem ciał antybiotycznych w przyrodzie.
The role of antibiotics substances in nature. **R-z.** *Przegląd Doświadczalnictwa Roln.,* III, 2, Poznań 1947, str. 79—85.

54. Marszewska-Ziemięcka J.: Znaczenie drobnoustrojów antybiotycznych dla żyzności gleby.
The Significance of Antibiotic Microorganisms for Soil Fertility. Referat plenarny wygłoszony na IX Zjeździe Polskiego Tow. Mikrobiologów we Wrocławiu w r. 1948. *Postępy Hig. i Med. Dośw.,* 1, Warszawa 1949, str. 147—160.

55. Marszewska-Ziemięcka J: Dotychczasowy wpływ mikrobiologii gleby na rozwój rolnictwa. **A.** Wydawn. powiel. Wydz. Gleboznawczego PINGW, Oddział Lub.-Kiel. w Puławach, Puławy 1950, stron 11.

56. Marszewska-Ziemięcka J.: Drobnoustroje a środowisko glebowe. Referat na Sekcji Naukowej UMCS w Lublinie, Lublin 1951.

57. Marszewska-Ziemięcka J. i Gołębiowska J.: The microbial characteristics of drained peaty soils. **K.** *Fourth Internat. Congress Microbiol.,* Copenhagen 1947, Kopenhaga 1949, p. 495—497.

58. Marszewska-Ziemięcka J. i Hauke-Pacewiczowa T.: Charakterystyka mikrobiologiczna gleb Białowieskiego Parku Narodowego. R. Złożono do druku w *Sprawozd. I. B. L.* w r. 1951.

59. Michniewicz M.: Ocena metod mikrobiologicznych określania urodzajności gleb.
An Estimate of Microbiological Methods of Determining the Soil Fertility. R. *Annales UMCS, S. E,* IV, Lublin 1949, str. 413—446.

60. Michniewicz M.: Mikroorganizmy jako wskaźniki urodzajności gleby. A. *Wszechświat,* 10 (1793), Kraków 1949, str. 313—316.

61. Michniewicz M.: Badania nad nitryfikacją i denitryfikacją w glebach Puszczy Białowieskiej.
Исследование нитрификации и денитрификации в почвах Беловежской пущи.
Investigations on the process of nitrification and denitrification in the soils of Białowieża. R. *Annales UMCS, S. C.,* (Biologia), VI, 2, Lublin 1951, str. 19—75.

62. Miłkowska D.: Bakterie rozkładające węglowodory — rozkład związków aromatycznych. Praca magisterska nie opublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS.

63. Miszustin J.: Środowisko a zmienność drobnoustrojów. A-r. Przekł. z ros. A. Urbana. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów z. 6. Problemy mikrobiologii gleby, *P. W. R. i L.,* Warszawa 1952, str. 3—12.

64. Miszustin J.: Nauka Dokuczajewa-Kostyczewa-Wiliamsa o glebie a zagadnienie składu drobnoustrojów w formach roślinnych. A-r. Przekład z ros. S. Ehrlicha. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów z 6. Problemy mikrobiologii gleby, P. W. R. i L., Warszawa 1952, str. 62—77.

65. Mikulski J.: Problemy mikrobiologii gleby. Uwagi o drobnej faunie glebowej A. *Post. Wiedzy Roln.* r. IV, z. 2, Warszawa 1952, str. 56—60.

66. Mowszowicz J.: Przyczynek do poznania fitocenoz mikologicznych biorących udział w rozkładzie drewna i ściółki leśnej.
Quelques rémarques sur les associations mycologiques. R. *Acta Soc. Bot. Polon.* XIX, 2, Warszawa 1948, str. 195—199.

67. Okruszko H.: Mikroorganizmy glebowe. A. Wiadomości Korespondenta Rolnego r. XIV, nr 8, Warszawa 1951, str. 4—6.

68. Prusinkiewicz Z.: Skład mikrofauny w górnych częściach profilu glebowego pod drzewostanem bukowym. K. *C.I.R. Biuletyn* nr 2 (4), Warszawa 1952, str. 79—81.

69. Roessler H., Wierzbicka A., Magdziak A. i Poznańska K.: Wzajemny wpływ drobnoustrojów glebowych na siebie. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 4 (6), Warszawa 1952, str. 81—82.

70. Rudakow K. i Birkiel M.: Rozwijająca się roślina a powstawanie próchnicy. A-r. Przekład z ros. K. Kleczkowskiego. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów z. 6. Problemy mikrobiologii gleby, P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 89—94.

71. Sabbo M.: Badania nad maczugowcami glebowymi. Praca magisterska nie opublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS.

72. Siedlanowska K.: Rozkład błonnika i asymilacja azotu w glebie w płodozmianie Wiliamsa. Praca magisterska nie opublikowana, Lublin 1951.

73. Skirgiełło A.: Flora mikologiczna Doliny Łomny (Czechosłowacja).
Flore mycologique de la vallée Lomna (Tchécoslovaquie). R. *Acta Soc. Bot. Polon.* t. XX, (1949/50), Warszawa 1950/51, str. 689—708.

74. Skrzyńska J.: Badania nad wpływem klimatu na mikroflorę gleb leśnych. **R.** Złożona do druku w I. B. L. w r. 1949.
75. Skrzyńska J.: Badania nad wpływem arsenianu wapnia (stosowanego w opylaniu lasów) na mikroflorę gleb leśnych. **R.** Złożono do druku w I. B. L. w r. 1949.
76. Skrzyńska J.: Mikroflory kopalne i kopalniane. **A.** *Wszechświat*, 1, (1784), Kraków 1949, str. 13—16.
77. Sokołówna J.: Studia nad występowaniem azotobaktera w glebach uprawnych na terenie Podkarpacia. **R.** Złożona do druku w 1950 r.
78. Stolarska A.: Rozprzestrzenienie maczugowców glebowych. Praca magisterska nie opublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS.
79. Szczepkowski T. W. i Skarżyński B.: Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. Cz. I. Układ cytochromowy i hemoproteidy *Thiobacillus thioparus i Th. thiooxydans.*
Биохимия автотрофных серобактерий. Часть I. Цитохромная система и гемопротеидные энзимы у *Th. thioparus* и *Th. triooxydans.*
The influence of mixed culture of red clover and thymothy on the microflora in their I, 2, Lublin 1952, str. 93—106.
80. Szember A.: Gleba magazynem i zimowiskiem drożdży. Artykuł. Sztandar Ludu nr 57, Lublin 1950, str. 1696.
81. Tuszyńska B.: Własności biochemiczne maczugowców glebowych. Praca magisterska nie opublikowana. Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS.
82. Urbańska M.: Morfologia i cytologia maczugowców glebowych. Praca magisterska nie opublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS.
83. Warteresiewicz M.: Mikroflora gleb leśnych z woj. krakowskiego. **R.** złożona do druku w czas. *Ekologia Polska* w 1954 r.

II. *Mikroflora korzeniowa*

a) ogólna

84. Balicka N.: Wyniki badań własnych nad rhizosferą roślin uprawnych. **A.** *Post. Wiedzy Roln.* r. IV, 4 (16), Warszawa 1952, str. 30—37.
85. Balicka N.: Wpływ siewu mieszanego koniczyny z tymotką na mikroflorę ich rhizosfery.
Влияние травосмеси красного клевера с тимофеевкой на микрофлору их ризосферы.
The influence of mixed culture of red clover and thymothy on the microflora in their rhizosphere. **R.** *Acta Microbiol. Polon.* I, 1. Lublin 1952, str. 58—64.
86. Balicka N.: O bakterioryzie. **A.** *Post. Wiedzy Roln.*, 2, Warszawa 1952, str. 61—68.
87. Dorosiński L.: Odżywianie się roślin poprzez korzenie a drobnoustroje. **A-r.** Przekład z ros. C. Święcickiego. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów z. 6 Problemy mikrobiologii gleby. PWRiL, Warszawa 1952, str. 95—101.
88. Jurkowska H.: Mikroflora rhizosfery w życiu roślin uprawnych. **A.** *Wszechświat*, 10 (1814), Kraków, 1951, str. 301—304.
89. Marszewska-Ziemięcka J.: Bakterie rhizosfery i ich rolnicze znaczenie. **R-z.** *Post. Wiedzy Roln.* nr 1—2, Warszawa 1950, str. 91—97.

90. Mikołajczyk M. i Łazózko W.: Badanie mikroflory w rizosferze lucerny i tymotki w siewach czystych i mieszanych. Praca magisterska nie opublikowana, Wrocław 1952.
91. Nowogrudski D.: W. R. Wiliams a problem symbiotrofizmu roślin wyższych. **A.** Przekład z ros. T. Pietkiewicza. *Post. Wiedzy Roln.*, r. II, nr 3, Warszawa 1950, str. 162—187.
92. Smalcówna U. i Zygalska H.: Badanie mikroflory w rizosferze koniczyny i rajgrasu włoskiego w siewach czystych i mieszanych. Praca magisterska nie opublikowana, Wrocław 1952.
93. Zachara M.: Badanie mikroflory w rizosferze koniczyny i tymotki w siewach czystych i mieszanych. Praca magisterska nie opublikowana, Wrocław 1952.

b) Mikoryza

94. Dominik T.: Znaczenie mikroflory glebowej dla rozwoju sadzonek sosnowych. **A.** Przegl. Leśn., Poznań 1946.
95. Dominik T.: Występowanie mykorhizy u dzikich drzew owocowych rosnących w lesie.
Les mycorrhizes chez les arbres fruitiers qui végètent sous la futai. **R.** *Acta Soc. Bot. Polon.*, XIX, 2, Warszawa 1948, str. 169—185.
96. Dominik T.: Przyczynek do znajomości mykorhizy u wiąza polnego.
Contribution a la connaissance du mycorrhize chez l'Orme champêtre. **R.** *Acta Soc. Bot. Polon.*, XIX, 2, Warszawa 1948, str. 189—193.
97. Dominik T.: Zagadnienie mykorhizy w leśnictwie. **A.** *Sylwan*. Warszawa 1949/50.
98. Dominik T.. Badania mykotrofizmu dzikich grusz na terenie Polski z uwzględnieniem warunków bioekologicznych.
Recherches sur les mycorrhizes des poiriers sauvages en ses biocenoses variées en Pologne. **R.** *Acta Soc. Bot. Polon.* XX, 1, (1949—50), Warszawa 1949/50, str. 255—303.
99. Dominik T.: Modrzew w lasach czerniejewskich pod Gnieznem i dynamika rozwojowa jego mykorhizy.
Le mélèze dans les forêts de Czerniejewo près de Gniezno et la dynamique du développement des ses mycorrhizes. **R.** *Acta Soc. Bot. Polon.* XX, 1, Warszawa 1949/50, str. 305—330.
100. Dominik T.: Badania mykotrofizmu roślinności wydm nadmorskich i śródlądowych.
Recherches sur le mycotrophisme des associations végétales sur les dunes du littoral de la mer et sur les dunes continentales. **R.** *Acta Soc. Bot. Polon.* XXI, nr 1—2, Warszawa 1952, str. 125—164.
101. Dominik T.: O roli mykorhizy w życiu niektórych drzew leśnych. **A.** *Las Polski* XXVI, nr 10, Warszawa 1952, str. 5—8.
102. Dominik T. i Jagodziński St.: Badania nad mykorhizą niektórych drzew owocowych w ogrodach kórnickich.
Researches on mycorrhiza of some fruit-trees in Kórnik-Gardens. **R.** *Pam. Zakł. Bad. Drzew i Lasu* z. 1, Kórnik 1946, str. 1—30.
103. Dominik T. i Kowalska H.: Zagadnienie mykorhizy w sadownictwie. **A.** *Przegl. Ogrod.*, nr 7—8. Kraków 1949.
104. Dominik T. i Truszkowska W.: Przyczynek do znajomości mykorhizy u niektórych paproci.

Contribution à l'étude des mycorrhizes de quelques fougères. R. *Acta Soc. Bot. Polon.* XVIII, 1, Warszawa, 1947 str. 45—63.

105. J a g i e l s k i A.: Zagadnienie mykorhizy w nauce radzieckiej. A. *Las Polski* r. XXV, nr 2—3, Warszawa 1951, str. 23—25.

106. K o r n a ś J.: Z biologii naszych storczyków. A *Wszechświat* 10 (1774), Kraków 1947, str. 293—297.

107. P a c h l e w s k i R.: Obserwacje nad rozwojem mykorhizy u degenerujących się drzew owocowych w szkółkach kórnickich.

Les observations sur le dévéloppement des mycorhizes chez quelques arbres fruitiers degénérés dans les pépinières des Jardins de Kórnik. R. *Acta Soc. Bot. Polon.* XXI, 4 (1952), Warszawa 1952, str. 577—590.

108. S t r z e m s k a J.: Wstępne sprawozdanie z pracy pt. Zagadnienie mikoryzy u zbóż, cz. I, Owies.

Образование микоризы у хлебных злаков. Ч. I. Овес.

The problem of mycorrhiza in corn plants. P. I. Oats. K. Wydawn. powiel. Wydz. Gleboznawczego PINGW Oddział Lub.-Kiel. w Puławach, Puławy 1949.

109. S t r z e m s k a J.: Zagadnienie mikoryzy u zbóż., Cz. I, Owies.

The mycorrhiza of corn plants. P. I. Oats. R. *Annales UMCS, S. E.* IV, 9. Lublin 1949, str. 359—372.

110. S t r z e m s k a J.: Zagadnienie mikoryzy. R-z. Wydawn. powiel. Wydz. Glebozn. PINGW, Oddział Lub.-Kiel., Puławy 1950, stron 13.

111. S t r z e m s k a J.: Bibliografia zagadnienia mikoryzy. 420 poz. Wydawn. powiel. Wydz. Gleboznawczego PINGW Oddział Lub.-Kiel. w Puławach. Puławy 1950.

112. S t r z e m s k a J.: Zagadnienie mikoryzy u zbóż. K. Streszczenia referatów XI Zjazdu Mikrobiologów Polskich w Krakowie w r. 1951.

113. S t r z e m s k a J.: Образование микоризы у хлебных злаков. K. *Mikrobiologia,* XX 2, Moskwa 1951, str. 120—121.

114. S t r z e m s k a J.:Badania nad mikoryzą roślin zbożowych. A. *Post. Wiedzy Roln* r. IV, 4 (16), Warszawa 1952, str. 38—41.

115. S t r z e m s k a J.. Zagadnienie mikoryzy u zbóż, Cz. II, Żyto, K. C.I.R. Biuletyn nr 2 (4), Warszawa 1952, str. 106.

116. S t r z e m s k a J.: Zagadnienie mikoryzy u zbóż, Cz. II, Żyto.

Образование микоризы у хлебных злаков. Ч. II Рожь.

The mycorrhiza of corn plants. P. II. Rye. R. *Acta Microbiol. Polon.* I, 1, Lublin 1952, str. 24—35.

117. T r u s z k o w s k a W.: Badania nad mykotrofizmem oraz zawartością glukozydów u trzech gat. *Digitalis* z naturalnych i sztucznych stanowisk.

Исследования над микотрофизмом и наличием глюкозидов у трех видов *Digitalis* из естественной и искуственной среды.

Recherches sur le mycotrophisme et le contenu de glucosides chez trois espèces de *Digitalis* dans les associations naturelles et dans les cultures. R. *Annales UMCS, S. C.,* V, 8, Lublin 1950, 279—305.

118. T r u s z k o w s k a W.: Badania nad mykotrofizmem nizinnego zespołu łąkowego na Psim Polu pod Wrocławiem.

Recherches sur le mycotrophisme de l'association végétale de la prairie située dans le bas-fond, à Psie Pole près de Wroclaw, R. *Acta Soc. Bot. Polon.* XXIV, 1—2 Warszawa 1952, str. 195—216.

119. T r u s z k o w s k a W. P a d u s z y ń s k a Z.: Badania mykotrofizmu zbóż uprawianych w USRR. R. *Post. Wiedzy Roln.* 3, Warszawa 1952, str. 38—40.

III. *Szczepionki dla roślin*

a) Motylkowych

120. Allen E. K. i Allen O. N.: Biochemiczne i symbiotyczne właściwości *Rhizobium*. A. Przekład z ang. A. Nowotny-Mieczyńskiej, *Post. Wiedzy Roln.* r. IV, z. 2 (14), Warszawa 1952, str. 69—75.
121. Barwińska M.: Adaptacja *Rhizobium lupini i Rh. japonicum* do rozwoju na sacharozie. Praca magisterska nie opublikowana, Lublin 1951.
122. Barwińska M.: Adaptacja *Rhizobium lupini* i *Rh. japonicum* do rozwoju na sacharozie. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 1, Warszawa 1951, str. 22.
123. Gołębiowska J.: O sposobie gospodarczym przygotowywania szczepionek dla roślin motylkowych. A. *Biul. Dośw. Masowego IUNG* nr 1, Warszawa 1951, str. 9—12.
124. Gołębiowska J.: Porównanie wpływu różnych podłoży na wartość szczepionek bakteryjnych dla roślin motylkowych. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 1, Warszawa 1951, str. 20.
125. Gołębiowska J.: Wpływ źródła pożywienia węglowego na aktywność bakterii brodawkowych K. *C. I. R. Biuletyn* nr 1, Warszawa 1951, str. 20.
126. Gołębiowska J.: Porównanie wpływu szczepienia czystymi kulturami *Rh. leguminosarum* i bakteroidami z brodawek korzeniowych na plony grochu. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 1, Warszawa 1951, str. 21.
127. Gołębiowska J.: Wpływ podłoża na aktywność bakterii brodawkowych. K. Streszczenia referatów XI Zjazdu Pol. Tow. Mikrobiol. w Krakowie w r. 1951.
128. Gołębiowska J.: Wpływ żywienia *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* różnymi związkami węgla na ich aktywność w symbiozie z rośliną.

    Влияние питания *Rhizobium trifolii* и *Rh. meliloti* разными соединениями углерода на их активность в симбиозе с растениями.

    The effect of the carbon source in the cultures of *Rh. trifolii* and *Rh. meliloti* upon the nitrogen fixation in the inoculated plants. R. *Acta Microbiol. Polon.* I, 4, Lublin 1952, str. 327—337.
129. Gołębiowska J.: Wyniki doświadczeń polowych ze szczepieniem roślin motylkowych. A. *Biul. Doświadczaln. Masowego IUNG* nr 4-5 (10-11), Warszawa 1952, str. 24—33.
130. Gołębiowska J. i Wróbel T.: Przydatność różnych podłoży do produkcji szczepionek dla roślin motylkowych.

    Пригодность разных сред для продукции препаратов клубенковых бактерий для инокуляции бобовых растений.

    The usefulness of various media for production of root nodule bacterial preparations for inoculation of leguminous plants. R. *Acta Microbiol. Polon.* I, 4, Lublin 1952, str. 313—326.
131. Górski M. i Koter M.: Korzyści siewów mieszanych roślin zbożowych z roślinami motylkowymi.

    Преимущество посева хлебных злаков вместе с бобовыми растениями.

    Advantages of mixed seeding of grain and leguminous plants. R. *Roczn. Nauk Roln.* t. LXVI, S. A., Warszawa 1952, str. 29—50.
132. Kobus J.: Niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych roślin motylkowych. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 1, Warszawa 1951, str. 22.

133. Kobus J.: Niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych roślin motylkowych.

Некоторые морфологические и физиологические признаки *Rhizobium*.

Some morphological and physiological properties of *Rhizobium*. R. *Acta Microbiol. Polon*, I, 2, Lublin 1952, str. 137—150.

134. Lityński A.: Brodawkowanie fasoli w różnych okresach jej wzrostu.

Nodulation of the bean in various periods of its growth. R. *Roczn. Nauk. Roln.* LIV, Warszawa 1950, str. 199—245.

135. Lityński T.: Czy bakterie *Rhizobium* wiążą azot znajdując się w formie pałeczek czy bakteroidów? A. *Wszechświat* 7 (1799), Kraków 1950, str. 222—223.

136. Lityński T.: Legcholeglobina, zielony barwik brodawek roślin motylkowych. A. *Wszechświat* 8, Kraków 1950, str. 253—254.

137. Marszewska - Ziemięcka J.: Dlaczego i jak szczepimy rośliny motylkowe. A. *Przegląd Rolniczy* nr 3, Poznań 1948, stron 21.

138. Marszewska - Ziemięcka J.: Szczepienie roślin motylkowych. A. *Sztandar Ludu* nr 277. Lublin 1948.

139. Marszewska-Ziemięcka J. i Gołębiowska J.: Wpływ szczepienia słodkiego łubinu na zawartość w nim alkaloidów i białka.

The influence of inoculation on the Alcaloid-and Protein content in Sweet Yellow Lupine. R. *Annales UMCS, S. E.*, III. 8, Lublin 1948, str. 173—195.

140. Marszewska - Ziemięcka J. i Gołębiowska J.: Dwuletnie wyniki doświadczeń polowych w Rolniczych Zakładach Dośw. — wykonane w latach 1948 i 1949 celem zbadania wpływu szczepienia bakteriami symbiotycznymi na plony roślin motylkowych. K. *C. I. R., Biuletyn* nr 1, Warszawa 1951, str. 23.

141. Nowotny - Mieczyńska A.: Hemoglobina w roślinach. A. *Wszechświat* 5 (1788), Kraków 1949, str. 139—142.

142. Nowotny - Mieczyńska A.: Biologiczne wiązanie azotu przez rośliny motylkowe w świetle najnowszych badań. R-z. *Post. Wiedzy Roln.* r. I, z. 1—2, Warszawa 1949, str. 166—202.

143. Nowotny - Mieczyńska A.: Badania nad współżyciem roślin motylkowych z niemotylkowymi w kulturach mieszanych. Cz. II.

An investigation of nitrogen uptake in mixed crops not receiving nitrogen manures. R. *Pamiętnik Puławski* t. XIX, Puławy 1949, str. 219—234.

144. Nowotny - Mieczyńska A: Studia nad brodawkami korzeniowymi roślin motylkowych. Cz. I. Pigmentacja brodawek.

Studies on the root nodules of leguminous plants. P. I.: The pigmentation of nodules. R. *PAU Prace rolniczo-leśne* nr 50, Kraków 1950, stron 35.

145. Nowotny-Mieczyńska A.: Obecny stan badań nad hemoglobiną w roślinach. R-z. *Post. Wiedzy Roln.* 3-4, str. 213—223, Warszawa 1951, str. 213—223.

146. Nowotny - Mieczyńska A.: Wpływ niektórych czynników na pigmentację brodawek roślin motylkowych.

Влияние некоторых факторов на пигментацию клубенков на корнях бобовых растений.

Some factors influencing the pigmentation of nodules of legmuinous plants. R. *Acta Microbiol. Polon.*, I, 1, Lublin 1952, str. 42—51.

147. Nowotny-Mieczyńska A.: Wzajemny wpływ roślin motylkowych na niemotylkowe w kulturach mieszanych. Cz. III. R. złożona do druku w *Roczn. Nauk Roln. i Leśn.* w 1952.

148. Nowotny-Mieczyńska A. i Gołębiowska J.: Problemy symbiotycznego wiązania wolnego azotu przez rośliny motylkowe. M. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 154.

149. Nowotny-Mieczyńska A. i Ruszkowska M.: Wpływ azotu mineralnego na rozwój szczepionych roślin motylkowych.

Влияние минерального азота на развитие инокулированных бобовых растений

The influence of mineral nitrogen on the growth of inoculated leguminous plants. R. *Acta Microbiol. Polon,* I, 3, Lublin 1952, str. 205—222.

150. Pacewiczowa-Hauke T.: Szczepionki dla *Galega officinalis.*

Селекция *Rhizobium* целью приготовления прививок для *Galega officinalis.*

Selection of *Rhizobium* suitable for inoculation of *Galega officinalis.* K. *Acta Microbiol. Polon.,* I, 1, Lublin 1952, str. 36—38.

151. Pacewiczowa-Hauke T.: Szczepionki galegi. K. C. I. R. Biuletyn nr 1, Warszawa 1951, str. 22.

152. Rudakow K.: Bakterie brodawkowe. A-r. Przekład z ros. K. Kleczkowskiego. *Post. Wiedzy Roln.*. Seria przekładów, z. 6. Problemy Mikrobiologii gleby. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 153—162.

153. Rudakow K.: Nitragina (Przegląd z lat 1944—1950). A-r *Post. Wiedzy Roln.* Przekład z ros. S. Ehrlicha. Seria przekładów, z. 6. Problemy Mikrobiologii gleby. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 172—187.

154. Rudakow K. i Birkiel M.: Bakterie brodawkowe, a tworzenie się trwałej struktury gleby. A-r. Przekład z ros. C. Swięcickiego. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów, z. 6. Problemy Mikrobiologii gleby. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 166—171.

155. Sikorska W.: Porównanie efektu szczepienia roślin motylkowych (łubinu i soi) szczepionkami laboratoryjnymi *Rhizobium* i uzyskiwanymi sposobem gospodarczym Praca magisterska nieopublikowana. Wrocław 1952.

156. Wróbel T.: Wpływ herbicidu 2,4-D na *Rhizobium.*

The influence of 2,4-D on *Rhizobium.* K. *Acta Microbiol. Polon.,* I, 1, Lublin 1952, str. 39—41.

b) Niemotylkowych

157. Balicka N.: Wpływ szczepienia roślin niemotylkowych azotobakterem.

Влияние прививания азотобактером небобовых растений.

The influence of inoculating non-leguminous plants with nitrobacteria K. *Roczn. Nauk Roln.* t. 66-A-1, Warszawa 1952, str. 185—186.

158. Blinkow K.: Rozwój azotobaktera i wiązanie azotu w kwaśnym i zasadowym środowisku A-r. Przekład z ros. K. Kleczkowskiego. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów z. 6. Problemy Mikrobiologii Gleby. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 118—125.

159. Duda J.: Badania nad wpływem syntetycznych kwasów huminowych na proces wiązania wolnego azotu przez azotobaktera.

Investigation on the influence of synthetic humic acids on the process of binding free nitrogen by the azotobacter. R. *Pozn. Tow. Przyj. Nauk. Prace Roln.-Leśne.* I, 3 Poznań 1950, str. 1—23.

160. Duda J. i Pędziwilk F.: Wpływ szczepienia azotobakterem na plony roślin.

Влияние прививки азотобактером на урожай растений.

The influence of nitrobacteria inoculation on crop yields. K. *Roczn. Nauk Roln.* t. 66-A-1, Warszawa 1952, str. 187.

161. Golińska J.: Wpływ szczepienia azotobakterem pomidorów i kapusty na ich plony.

The influence of inoculation with *Azotobacter* on tomato and cabbage yields. R. *Roczn. Nauk Roln.*, 53, Warszawa 1949, str. 133—136.

162. Gołębiowska J.: Znaczenie azotobaktera dla żyzności gleby. A. Instruktor Rolniczy nr 6, P. W. R. i L. Warszawa 1949, str. 39—40.

163. Górecka A.: Porównanie wpływu superfosfatu granulowanego i pylastego na rozwój azotobaktera w glebie. Praca magisterska nieopublikowana. Wrocław 1952.

164. Gromadzka M.: Azotobakter i owady. A. *Wszechświat* 1, (1793), Kraków 1950, str. 28.

165. Heller I. i Chariton J.: Rola azotobaktera w glebie płodozmianu trawopolnego. A-r. Przekład z ros. S. Ehrlicha *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów z. 6. Problemy mikrobiologii gleby. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 109—116.

166. Jelfimowa E.: Przedsiewne szczepienie nasion wieloletnich mieszanek bakteriami. A-r. Przekład z ros. C. Święcickiego. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów, z. 6. Problemy mikrobiologii gleby. P. W. R. i L. Warszawa 1952, str. 191—197.

167. Maliszewska W.: Działanie szczepionek azotobaktera na rośliny. A. Złożony do druku czas. *Nowe Rolnictwo* w r. 1952.

168. Marszewska-Ziemięcka J. i Maliszewska W.: Szczepienie drobnoustrojami roślin niemotylkowych. Inoculation of nonleguminous plants. R. Wydawn. powiel. Wydz. Gleboznawczego PINGW Oddział Lub.-Kiel. w Puławach. Puławy 1949.

169. Marszewska-Ziemięcka J. i Maliszewska W.: Wyniki doświadczeń zespołowych nad wpływem szczepionki azotobaktera na plony roślin uprawnych. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 2 (4), Warszawa 1952, str. 104—105.

170. Marszewska-Ziemięcka J. i Maliszewska W.: Badania nad szczepionkami dla roślin niemotylkowych. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 2 (4). Warszawa 1952, str. 102—104.

171. Mieszkow N.: Wpływ wydzielin korzeni grochu i kukurydzy na rozwój azotobaktera i innych drobnoustrojów glebowych. A. Przekład z ros. R. Majchrzaka. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów z. 6. Problemy mikrobiologii gleby. P. W. R. i L., Warszawa 1952, str. 127—134.

172. Ozimowska I.: Działanie azotobakteryjnych szczepionek na plony niektórych roślin uprawnych. R. Złożono do druku w *Roczn. Nauk Roln.* w r. 1952.

173. Wielocka H.: Oznaczenie siły wiązania wolnego N przez różne szczepy azotobaktera. Praca magisterska. Lublin 1951.

174. Wielocka H.: Siła wiązania wolnego azotu przez różne szczepy azotobaktera.

Сила связывания свободного азота разными видами азотобактера

The potency of assimilating free nitrogen by various strains of nitrobacteria. K. *Roczn. Nauk Roln.* t. LXVI-A-1, Warszawa 1952, str. 186—187.

175. Żuk D.: Wpływ szczepienia azotobakterem na rozwój gorczycy białej. Praca magisterska nieopublikowana. Wrocław 1952.

IV. *Mikroflora obornika i kompostów*

176. Duda J., Wojciechowski J. i Żuchowska B.: Badania nad określeniem optymalnych warunków humifikacji materii organicznej. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 4 (6), Warszawa 1952, str. 80.
177. Marszewska-Ziemięcka J., Gołębiowska J. i Bosak-Hauke T. Porównanie składu mikroflory kompostów roślinnych i obornika oraz ich działania na plony roślin. K. *C. I. R. Biuletyn* nr 2 (4). Warszawa 1952, str. 105—106.
178. Marszewska-Ziemięcka J., Gołębiowska J. i Bosak-Hauke T.: Porównanie składu mikroflory kompostów roślinnych i obornika oraz ich działania na plony roślin.
Сравнение состава микрофлоры растительных компостов и навоза и влияние их на плодородие растений.
The Microbial Composition of Dung and Plant Composts and their Manuring Value. R. *Roczn. Nauk Roln.*, LIII, Warszawa 1949, str. 354—362.
179. Żuchowska B.: Mikrobiologiczna analiza obornika na ściółce torfowej. R. *Sprawozd. Inst. Torfowego*, Katowice 1952, str. 89—99.

V. *Różne*

180. Bylicka H., Jarosz B., Nowicka I. i Kunicki-Goldfinger Wł.: Substancje antybiotyczne porostów, cz. I.
Антибиотики из лишайников. Ч. I.
Antibiotic substances from lichenes. P. I. R. *Acta Microbiol. Polon.*, I, 3, Lublin 1952, str. 185—192.
181. Czosnowski J.: Przyczynek do hydrobiologii kałuż. Contribution to the knowledge of the hydrobiology of puddles. R. *Acta Soc. Bot. Polon.*, XXI, 3. Warszawa 1952, str. 317—327.
182. Duda J. i Pędziwilk F.: Wpływ soli sodowej dwunitrokrezolu oraz soli sodowej kwasu dwuchlorofenoksyoctowego (2.4-D) na mikroflorę gleb. K. *Biuletyn C. I. R.* nr 1, Warszawa 1951, str. 24—25.
183. Duda J. i Pędziwilk F.: Wpływ preparatu 2,4-D i dwunitrokrezolu na mikroflorę gleb.
Влияние 2, 4 D и динитрокрезола на микрофлору почвы.
The effect of 2,4-D and of dinitrocresol upon the soil microorganisms. R. *Acta Microbiol. Polon.*, I, 3, Lublin 1952, str. 193—204.
184. Guzowska B., Orzechowska B., Kunicki-Goldfinger Wł.: Własności fitoncydów cebuli, *Allium cepa L.*, cz. I.
Фитонциды лука *Allium cepa* L. Ч. I.
The phytoncides of *Allium cepa L.* p. I. R. *Acta Microbiol. Polon.*, I, 3, Lublin 1952, str. 175—184.
185. Jurkowska H.: Bakteriofagi. A. *Wszechświat*, 5 (1763), Kraków 1946, str 154—156.
186. Jurkowska H.: Wiązanie azotu przez sinice. *A. Wszechświat*, 1 (1775), Kraków 1948, str. 19—21.
187. Jurkowska H.: Badania nad zdolnością przystosowania się kropidlaka *(Aspergillus niger)* do miedzi. K. *Biuletyn C. I.* R. 2 (4), Warszawa 1952, str. 100—102.
188. Jurkowska H.: Zdolność przystosowania się kropidlaka *(Aspergillus niger)* do miedzi.
Способность адаптации к меди *Aspergillus niger*.

The adaptation of *Aspergillus niger* to copper. **R.** *Acta Microbiol. Polon.*, I, 2 Lublin 1952, str. 107—122.

189. Magdziak A.: Wpływ fitoncydów cebuli na *P. aurelia*. Praca magisterska nieopublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin.
190. Marcińczak J.: Krytyczne opracowanie metody ilościowego oznaczania mikroflory glebowej. Praca magisterska nieopublikowana. Zakład Mikrobiologii Roln. U.P., Poznań.
191. Marszewska-Ziemięcka J.: Znaczenie gospodarcze grzybów. **A.** *Biul. Inf. Sekcji Dydakt. Nauk. Biol.* w Lublinie, rok I, Lublin 1950, str. 11.
192. Marszewska - Ziemięcka J.: Fitoncidy.
The bactericidal power of plants. **A.** *Przegl. Doświadcz. Roln.*, III, 3, Poznań 1947, str. 220—222.
193. Marszewska - Ziemięcka J.: Zakład Mikrobiologii Rolniczej Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej. **A.** Trybuna Ludu nr 183, Warszawa 1951.
194. Marszewska-Ziemięcka J.: Zakład Mikrobiologii Glebowej. **A.**, złożony do druku w Trybunie Ludu w r. 1951.
195. Marzec A.: Wpływ toksyn bakteryjnych na pierwotniaki. Praca magisterska nieopublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin.
196. Matusiak K.: Próba zastosowania aparatu hydrometrycznego J. Tokarskiego do badań mikrobiologicznych gleb. **K.** *Biuletyn C.I.R.* nr 1, Warszawa 1951, str. 63.
197. Poznańska K.: Otrzymanie jałowej hodowli *P. aurelia*. Praca magisterska nieopublikowana. Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin.
198. Roessler H.: Próby otrzymania hodowli pierwotniaków wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych. Praca magisterska nieopublikowana. Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMSC, Lublin.
199. Rossowska W. i Gudkowa T.: Metodyka analizy ilościowej drobnoustrojów-antagonistów w glebie. *A-r.* Przekład z ros., tłum. K. Kleczkowski. *Post. Wiedzy Roln.* Seria przekładów, z. 6. Problemy mikrobiologii gleby. P. W. R. i L., Warszawa 1952, str. 147—152
200. Świątek Z.: Własności substancji antybiotycznych porostów. Praca magisterska nieopublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS. Lublin.
201. Woźniak M.: Substancje antybiotyczne porostów. Praca magisterska nieopublikowana, Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMSC, Lublin.

VI. *Podręczniki*

202. Dominik T.: Mykorhiza. Broszura dydaktyczna. P. W. R. i L., Warszawa 1951, stron 63.
203. Duda J.: Ćwiczenia z mikrobiologii rolniczej. Skrypt, wyd. P. W. N., Poznań 1952, stron 103.
204. Fiodorow M.: Mikrobiologia. Podręcznik. Przekład z IV wyd. ros. R. Majchrzaka. P. W. R. i L., Warszawa 1952, stron 420.
205. Fiodorow M.: Ćwiczenia praktyczne z mikrobiologii. Podręcznik. Przekład z ros. pod red. Wł. Kunickiego - Goldfingera. P. W. R. i L., Warszawa 1952.
206. Gajewski W.: Symbioza. Broszura dydaktyczna. Biblioteka Przyrodnicza, II wyd. P. Z. W. S., Warszawa 1950, stron 55.

207. Gołębiowska J.: Ćwiczenia z mikrobiologii rolniczej. Skrypt dla studentów II sem. Wydziału Rolnego UMCS w Lublinie. P. Z. W. S., Warszawa 1950, stron 47.
208. Gołębiowska J.: Przewodnik metodyczny do podręcznika „Mikrobiologia" M. Fiodorowa. Szkoła Główna Gosp. Wiejsk. w Warszawie, Rolnicze Studium Zaoczne, Warszawa 1952, stron 73.
209. Lipska I. i Ziemięcka J.: Ćwiczenia z mikrobiologii rolniczej. Podręcznik. P. W. R. i L., Warszawa 1950, stron 114.
210. Mikrobiologia rolnicza. Wydawnictwo zbiorowe pod ogólną redakcją J. M.-Ziemięckiej.
Tom I. Matuszewski T.: Wstęp do mikrobiologii rolniczej. Podręcznik. Biblioteka Puławska nr 23, Puławy 1947, stron 236, rys. 32.
211. Mikrobiologia rolnicza. Wydawnictwo zbiorowe pod ogólną redakcją J. M.-Ziemięckiej.
Tom. II. Marszewska - Ziemięcka J.: Zarys mikrobiologii gleby. Podręcznik. Biblioteka Puławska, P. I. W. R., Warszawa 1948, stron 248.
212. Marszewska - Ziemięcka J.: Drobnoustroje pożyteczne w życiu codziennym. Podręcznik. Biblioteka Popularno-Naukowa nr 31 „Książka i Wiedza", Warszawa 1951.
213. Musiewicz A: Organizmy glebowe. Broszura dydaktyczna. P. I. W. R., Warszawa 1949, stron 70.
214. Różycki Z.: Drobnoustroje i ich znaczenie w rolnictwie. Podręcznik. Wyd. Zw. Samopomocy Chłopskiej, Bibl. Sam. Chł. nr 18, Warszawa 1947, stron 126.
215. Strzemski M.: Czynniki glebotwórcze. Cz. III: Czynniki biotyczne. A. Swiat roślinny. Praca dydakt. Prace Wydz. Glebozn. nr 6, P. I. N. G. W. (wydawn. powiel.), Puławy 1949, stron 40.
216. Strzemski M.: Czynniki glebotwórcze. Cz. III.: Czynniki biotyczne. B. Fauna glebowa. Praca dydakt. Prace Wydz. Glebozn. nr 7, P. I. N. G. W. (wydawn. powiel.), Puławy 1949, stron 16.
217. Winogradski S.: Mikrobiologia gleby — Zagadnienia i metody — 50 lat badań. (Tytuł oryginału: Microbiologie du sol Problemes et methodes — 50 ans de recherches). Zbiór dzieł, tłumaczenie zbiorowe z jęz. francuskiego pod ogólną redakcją J. M.-Ziemięckiej, P. W. R. i L., 1953, stron 843.
218. Zabłocki B.: Chemia bakteryjna. Cz. I i II. Skrypt. Nakładem P. W. N. Łódź 1951, str. 405.
219. Zodrow K.: Mikrobiologia ogólna. Skrypt. P. W N., Poznań 1952, stron 134, rys. 52,

OBJAŚNIENIA

K — komunikat
A — artykuł
M — monografia
R — rozprawa
R-z — referat zbiorowy
A-r — Artykuł-rozprawa

SPIS TREŚCI

J. Janicki, J. Pawełkiewicz, St. Stawicki i K. Zodrow: Wytwarzanie witaminy B_{12} przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces* 3

D Shugar i J. Baranowska: Badania nad mechanizmem barwienia metodą Grama. Rola białek 11

T. Mierzejewski: Badania nad składem węglowodanowym ektoplazmy *Corynebacterium equi* 21

Wł. Błaszczak: Badania nad skutecznością działania środków dezynfekcyjnych (formalina, sublimat) na żywotność sklerot *Rhizoctonia solani* Kuehn. 29

Wł. Ostrowski: Zastosowanie metod mikrobiologicznych do analizy biochemicznej 35

A. Szember: Zarys rozwoju badań mikrobiologicznych nad kiszonkami paszowymi 47

J. Strzemska: Bibliografia Polskiej Mikrobiologii Glebowej. Lata 1945—1952 63

Содержание

Я. Яницки, Ю. Павелкевич, С. Ставицки и К. Зодров: Образование витамина B_{12} актиномицетами из рода *Streptomyces* 3

Д. Шугар и Я. Барановска: Исследования над реакцией Грама. Роль белков при окрашивании по методу Грама 11

Т. Межеевски: Исследования над углеводным составом эктоплазмы *Corynebacterium equi* 21

В. Блащак: Эффективность воздействия дезинфектантов (формалин, сулема) на жизнеспособность скелероций *Rhizoctonia solani Kuechn.* 29

В. Островски: Применение микробиологических методов к биохимическому анализу 35

А. Шембер: Очерки по развитию микробиологических исследований над силосами 47

Я. Стжемска: Библиография почвенной микробиологии в Польше за время с 1945 по 1952 г. 63

CONTENTS

J. Janicki, J. Pawełkiewicz, St. Stawicki and K. Zodrow: Vitamin B_{12} production by *Streptomyces* 3
D. Shugar and J. Baranowska: Studies on the gram-stain — the importance of proteins in gram reaction 11
T. Mierzejewski: Studies on the polysaccharides of ectoplasma of *Corynebacterium equi* 21
Wł. Błaszczak: The effect of desinfectants (formaldehyde, mercuric chloride) on the vitality of sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kuehn . 29
Wł. Ostrowski: Microbiological methods for assaying vitamins and aminoacids 35
A. Szember: The review of microbiological studies on the fodder silages 47
J. Strzemska: Index of Polish agricultural-microbiological literature for the years 1945—1952 63

STAN TEORII BUDOWY
ZWIĄZKOW ORGANICZNYCH

Cena w opr. pł. zł 9,65

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO NAUKOWE

PRENUMERATA NA ROK 1954

czasopism naukowych

POLSKIEJ AKADEMII NAUK, TOWARZYSTW NAUKOWYCH
I PAŃSTWOWEGO MUZEUM ARCHEOLOGICZNEGO

wydawanych przez
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Tytuł	Ilość nr w roku	Prenumerata roczna zł
Acta Biochimica Polonica	4	60,—
Acta Geologica Polonica	4	80,—
Acta Geophysica Polonica	4	48,—
Acta Microbiologica Polonica	4	40,—
Acta Physica Polonica	4	48,—
Archiwum Budowy Maszyn	4	60,—
Archiwum Hydrotechniki	4	60,—
Archiwum Górnictwa i Hutnictwa	4	60,—
Archiwum Elektrotechniki	4	60,—
Archiwum Mechaniki Stosowanej	4	60,—
Biuletyn PAN Wydz. II (jęz. ros.)	4	20,—
Biuletyn PAN Wydz. III (jęz. ros.)	10	50,—
Biuletyn PAN Wydz. IV (jęz. ros.)	4	20,—
Biuletyn PAN Wydz. II (jęz. zach.)	4	20,—
Biuletyn PAN Wydz. III (jęz. zach.)	10	50,—
Biuletyn PAN Wydz. IV (jęz. zach.)	4	20,—
Chrońmy przyrodę ojczystą	6	24,—
Ekonomista	4	60,—
Folia Biologica	4	48,—
Geodezja i Kartografia	4	40,—
Kwartalnik Historyczny	4	60,—
Kwartalnik Historii Kultury Materialnej	4	60,—
Kwartalnik Instytutu Polsko-Radzieckiego Sovietica	4	40,—
Kwartalnik Neofilologiczny	4	60,—
Myśl Filozoficzna	4	60,—
Nauka Polska	4	80,—
Postępy Fizyki	4	40,—
Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej	4	48,—
Przegląd Geograficzny	4	40,—
Przegląd Historyczny	4	48,—
Przegląd Statystyczny	4	48,—
Przegląd Orientalistyczny	4	48,—
Roczniki Chemii	4	80,—
Sprawozdania z Czynności i Prac PAN	4	20,—
Wiadomości Archeologiczne	4	48,—
Wszechświat	10	40,—

Organ Min. Szkol. Wyższego i Gł. Zarz. Zw. Zaw. Nauczycielstwa Polskiego „Życie Szkoły Wyższej" — 12 × w roku 96 zł rocznie.

Prenumeratę na rok 1954 przyjmuje Centr. Ekspedycja PPK „Ruch", Warszawa, Srebrna 12, konto PKO 1-110-28504. Nakłady ograniczone. Regularną dostawę czasopism zapewni tylko prenumerata.

Informacji w sprawie prenumeraty opłacanej w kraju z zleceniem wysyłki za granicę udziela oraz zamówienia przyjmuje Oddział Wydawnictw Zagranicznych PPK „RUCH", Sekcja Eksportu, Warszawa, Aleje Jerozolimskie 119, tel. 805-05.

Cena zł 10